



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

030 E Bioquímica Clínicomédica e Inmunología 2ª Edición

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Medicina

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Servicio de Hematología

DAÑO OXIDATIVO EN LA LEUCEMIA  
LINFÁTICA CRÓNICA Y LA LINFOCITOSIS B  
MONOCLONAL.  
ASOCIACIÓN CON ALTERACIONES  
CROMOSÓMICAS.

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup> Isabel Oliver Domínguez**

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia

Directores:

Dr. Guillermo Sáez Tormo

Dr. Félix Carbonell Ramón

Dra. Rosa María Collado Nieto

Valencia 2015



**Don Guillermo Sáez Tormo** Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología-INCLIVA de la Universidad de Valencia y perteneciente al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset, **Don Félix Carbonell Ramón**, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe del Servicio de Hematología del Hospital General Universitario de Valencia y Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y **Doña Rosa María Collado Nieto**, Doctora en Biología y Responsable de la sección de Citogenética y Biología Molecular del Servicio de Hematología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

INFORMAN: Que **M<sup>a</sup> Isabel Oliver Domínguez**, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y en el Servicio de Hematología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, el trabajo de investigación titulado: **“Daño oxidativo en la Leucemia Linfática Crónica y la Linfocitosis B Monoclonal. Asociación con alteraciones cromosómicas.”**, que presenta para la obtención del grado de Doctora en Biología.

*Y para que así conste, en el cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Valencia, a 24 de octubre de 2015.*

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo

Fdo. Dr. Félix Carbonell Ramón

Fdo. Dra. Rosa María Collado Nieto



*Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto PI13/01848, integrado en el Plan Estatal de I+D+I 2013-2016 y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).*



**A mi familia**





A veces los ánimos que necesitas aparecen en un cajón olvidado...

«Si os apasiona la ciencia haceros científicos. No penséis lo que va a ser de vosotros. Si trabajáis firme y con entusiasmo, la ciencia llenará vuestra vida»

Severo Ochoa



## Agradecimientos

Los que me conocéis bien sabéis lo que me ha costado llegar hasta aquí, y por no perder jamás la esperanza en mi, quiero empezar dándoos las gracias.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis el Dr. Félix Carbonell, el Dr. Guillermo Sáez y la Dra. Rosa Collado por confiar en mi para llevar a cabo esta tesis, enseñarme todo lo que sé de hematología, bioquímica y genética y hacer que este proyecto finalmente viese la luz.

Especialmente quiero darle una y mil gracias a Rosa, quién desde que llegué como una simple becaria me ha tratado como a una igual, me ha ayudado a crecer científicamente pero mucho más personalmente, dándome esos ánimos y esa paciencia que sabemos que en algunos momentos me ha faltado. Una vez más, gracias Rosa.

Agradecer en especial a todos los miembros del Servicio de Hematología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia tanto médicos, como enfermeros/as y auxiliares por su ayuda incondicional, y sobretodo a mi gran compañera Merche porque siempre tuvo una palabra de ánimo para mi. Gracias de todo corazón a los pacientes incluidos en este estudio, porque sin ellos no habría sido posible.

Agradecer al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, en especial a M<sup>a</sup> Carmen, Susana y Jorge por su gran compañerismo y sus ganas de enseñarme.

Gracias a mi madre porque no hay amor más grande que el que me das y me has hecho llegar en cada momento de esta tesis, y sé que has sufrido tanto como yo para que ésta llegara a su fin, y ¿sabes qué?: ¡Qué lo hemos conseguido! Te adoro mamá.

A mis queridos padres, Justo y Toni porque sois un gran ejemplo a seguir y uno de mis pilares en esta vida, infinitas gracias.

A mis hermanas Cristina, Alicia y Zaida, por ser como sois y quererme tanto, os quiero. Al final la he acabado enana y algún día te espero en mi sofá para leerla a tu lado.

A mis sobrinos Alexa, Tessa, Sarah y Hugo, porque os quiero a rabiar y espero que cuando seáis mayores estéis orgullosos de vuestra tía.

A Jose, mi amigo, compañero y marido, por apoyarme tanto y darme fuerzas cuando ya apenas me quedaban, por compartir tu vida conmigo y sacrificar tanto tiempo para que esta tesis viese la luz. Te quiero.

A mi hijo Iván, por hacerme renacer como el Ave Fénix de sus cenizas y enseñarme lo que es el amor más puro y sincero, no hay palabras que describan el amor que siento por ti. Gracias por existir.

...Avião sem asa, fogueira sem brasa, sou eu assim sem você. Futebol sem bola, piu-piu sem frajola, sou eu assim sem você....T'estime Maria.

A Peris, Montse, Ferran, Ana y Mónica, por estar siempre al pie del cañón y confiar en mi.

Gracias a Luis y Mario, por apoyarme en los inicios de mi tesis y saber que siempre puedo contar con vosotros.

Gracias a Sole, por apoyarme, escucharme y convertirme en una de mis mejores amigas. Porque la vida se encarga de poner en tu camino personas que demuestran con sus acciones, que para ser familia, no hace falta tener la misma sangre. Tampoco olvido a Mariano, eres pura ciencia. Doy gracias al destino por ponerlos en mi camino ¡obvio!

A mi gran familia de la cual estoy muy orgullosa y sobretodo a Manoli, Marisa, Nuria y Alfonso por estar ahí dándome apoyo.

A Raquel, Paloma y Sophie, por formar parte de mi vida y darme justo hace un año el empujoncito que necesitaba para acabar esta tesis.

A Judit i Sandra, les meves amigues de sempre, per donar-me ànims des de la distància, us estimo.

Agradecer a mis compañeros y compañeras del IVAMI por estar ahí en estos momentos finales de mi tesis, y por darme la oportunidad de formarme en microbiología.

El camino ha sido largo, y el destino ha hecho que no todos los que empezaron este camino conmigo sigan a mi lado, y seguro que me he dejado a alguien en el tintero, os doy las a todos las gracias.

A mi yaya Loli, a mi abuela Isabel y a mi tío Manolo os tengo presentes siempre. Aunque la vida os alejó de mi lado, sé que desde donde estéis os sentís orgullosos de mi.

### Abreviaturas

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosina difosfato

AHAI: Anemia hemolítica autoinmune

ARN: Ácido ribonucleico

ATM: Gen de la Ataxia telangiectasia mutado

ATP: Adenosina trifosfato

BCR: Receptor de células B

BSA: Seroalbúmina bovina

C: Citosina

CAT: Catalasa

ClK: Cloruro de potasio

CM: Células mononucleares

CSF: Factores estimuladores de colonias hematopoyéticas

DAPI: 4,6 diamino-2-fenilindol

Del: Deleción

dG: Desoxiguanina

DMSO: Dimetilsulfóxido

dTG: Timidina glicol

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FDNB: Fluoronitrobenceno

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

F<sub>2</sub>-IsoP: F<sub>2</sub>-Isoprostanos

G: Guanina

GC: Guanina Citosina

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GTG: Bandas G obtenidas con Tripsina y Giemsa

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

HLA: Antígeno de histocompatibilidad

## Abreviaturas

HMU: 5-hidroximetil uracilo

HMdU: 5-hidroxi-2'-desoxiuridina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

i.v.: Intravenoso

Ig (IgA, IgM, IgG): Inmunoglobulina (clase A, M, G)

*IGHV*: Región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

IL: Interleucina

ISCN: Sistema internacional de nomenclatura de citogenética humana

IWCLL: Grupo internacional de trabajo en la leucemia linfática crónica

kDa: Kilodalton

LA: Leucemia aguda

LBM: Linfocitosis B monoclonal

LBP: Linfocitosis B policlonal

LDH: Lactatodeshidrogenasa

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LLC: Leucemia linfática crónica

LLC-B: Leucemia linfática crónica de linfocitos B

LLC-NM: Leucemia linfática crónica sin hipermutación somática de *IGHV*

LLC-M: Leucemia linfática crónica con hipermutación somática de *IGHV*

LLP: Linfoma de linfocitos pequeños

LMA: Leucemia mieloide aguda

LNH: Linfoma no hodgkin

LPL: Lipoprotein lipasa

LPS: Lipopolisacárido

MO: Médula ósea

MDA: Malondialdehido

MM: Mieloma múltiple

mRNA : Ácido ribonucleico mensajero

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NP-40: Detergente Nonidet P-40

O<sub>2</sub> •<sup>-</sup>: Radical superóxido

•OH: Radical hidroxilo

8-oxo-dG: 8-hidroxi(oxo)-2'-desoxiguanosina

8-oxo-G: 8-hidroxi(oxo)guanina

PBS: Tampón fosfato salino

## Abreviaturas

PCA: Ácido perclórico  
r.p.m.: Revoluciones por minuto  
*RB*: Gen del retinoblastoma  
RL: Radical libre  
RNA: Ácido ribonucleico  
ROS: Especie reactiva del oxígeno  
SDS: Dodecil sulfato sódico  
SLPc: Síndrome linfoproliferativo crónico  
SMD : Síndrome mielodisplásico  
Smlg: Inmunoglobulina de superficie de membrana  
SOD: Superóxido dismutasa  
MnSOD: Superóxido dismutasa mitocondrial  
CuZnSOD: Superóxido dismutasa citosólica  
T: Timina  
TA: Timina Adenina  
TBA: Ácido tiobarbitúrico  
TG: Timina glicol  
TPA: Acetato de tetraforbol  
TE: Tris - EDTA  
UV: Ultravioleta  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular





<b>I.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.- La leucemia linfática crónica.....	3
1.1.- Etiopatogenia.....	4
1.2.- Diagnóstico y estadios clínicos.....	6
1.3.- Alteraciones citogenéticas.....	9
1.4.- Factores pronósticos.....	19
1.5.- Evolución clonal.....	23
2.- La linfocitosis B monoclonal.....	24
2.1.- Definición y características clínicas.....	24
2.2.- Epidemiología.....	25
2.3.- Alteraciones genéticas y moleculares.....	28
3.- El estrés oxidativo.....	30
3.1.- Radicales libres y especies reactivas del oxígeno.....	31
3.2.- Fuentes biológicas de especies reactivas del oxígeno.....	33
- Fuentes endógenas.....	34
- Fuentes exógenas.....	35
3.3.- Mecanismos de defensa antioxidante.....	35
- Antioxidantes enzimáticos.....	35
- Antioxidantes no enzimáticos.....	38
- Antioxidantes coadyudantes o secundarios.....	41
3.4.- El daño oxidativo.....	41
- Lípidos.....	41
- Proteínas.....	44
- Glúcidos.....	44
- ADN.....	44
3.5.- Biomarcadores de estrés oxidativo.....	47
3.6.- Implicaciones clínicas del estrés oxidativo.....	47
3.7.- Estrés oxidativo y cáncer.....	48
3.8.- Metabolismo oxidativo en la LLC y en la LBM.....	52
<b>II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>

## Índice

<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
1- Pacientes estudiados.....	61
2.- Recogida y procesamiento de las muestras.....	61
3.- Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	64
4.- Determinación de parámetros de estrés oxidativo.....	67
4.1.- Cuantificación de proteínas.....	67
4.2.- Determinación de 8-oxo-dG.....	68
4.3.- Determinación de la actividad del Glutati3n.....	69
4.4.- Determinación del Malondialdehido (MDA).....	70
4.5.- Determinación de la actividad enzimática de la catalasa.....	71
4.6.- Determinación de 8-isoprostanos.....	72
5.- Análisis estadístico.....	73
<b>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN ARGUMENTAL.....</b>	<b>75</b>
1.- Características generales de los pacientes con LBM y LLC.....	77
1.1.- Datos clínico-biológicos en pacientes con LBM y LLC.....	77
1.2.- Datos clínico-biológicos en el grupo control.....	79
2.- Alteraciones citogenéticas.....	80
2.1.- Resultados FISH individuos control.....	80
2.2.- Resultados FISH en pacientes con LBM.....	80
2.3.- Resultados FISH en pacientes con LLC.....	83
3.- Descripción del estatus oxidativo en la LBM y LLC.....	87
3.1.- Estudio del daño oxidativo del ADN: determinación de 8-oxo-dG.....	88
3.2.- Peroxidación lipídica: cuantificación de MDA.....	92
3.3.- Niveles de 8-isoprostanos (8-iso-PGF <sub>2α</sub> ) en orina .....	93
3.4.- Niveles de glutati3n.....	94
3.5.- Determinación actividad enzimática antioxidante de la catalasa.....	96

4.- Correlación del metabolismo oxidativo y parámetros clínico biológicos en la LLC.....	98
4.1.- Estrés oxidativo y morfología linfocitaria.....	98
4.2.- Estrés oxidativo y expresión de CD38 y ZAP70.....	98
4.3.- Estudio del metabolismo oxidativo según el estadio de Binet.	102
5.- Metabolismo oxidativo en relación con la evolución temporal de los pacientes con LLC.....	103
6.- Metabolismo oxidativo en los subgrupos citogenéticos de la LLC.....	104
<b>V.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>VI.- ANEXOS.....</b>	<b>115</b>
1.-Publicaciones.....	117
1.1.- Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis.....	119
1.2.-Increased oxidative damage associated with unfavorable cytogenetic subgroups in Chronic Lymphocytic Leukemia.....	125
2.- Tablas pacientes.....	131
3.- Protocolos laboratorio.....	145
<b>VI.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>169</b>



# **Introducción**



# I.- INTRODUCCIÓN

## 1.- La leucemia linfática crónica

La leucemia linfática crónica (LLC) es el síndrome linfoproliferativo crónico (SLPc) más frecuente entre la población de edad avanzada en el mundo occidental. El término SLPc engloba diferentes patologías cuyo origen se debe a la expansión clonal de linfocitos B o T en diferentes estados de diferenciación y/o activación celular.

La LLC-B se caracteriza por la expansión monoclonal y acumulación de linfocitos B CD5+. La linfocitosis que caracteriza a esta enfermedad puede ir acompañada por infiltración en los tejidos, manifestándose en forma de citopenias, adenopatías o visceromegalias.

La primera descripción de la enfermedad la realizó Türk en 1903 (Türk, 1903) y fue sobre 1924 cuando Minot e Isaacs realizaron sus primeros estudios sobre las particularidades clínicas y evolutivas de la enfermedad (Sahota y cols., 2000). En 1967, Dameshek formuló la clásica definición de la LLC como “*una enfermedad debida a la acumulación progresiva de linfocitos inmunoincompetentes*” (Dameshek, 1967). Y más tarde, en 1979 se creó el *International Workshop on CLL* (IWCLL) bajo la iniciativa de Binet (Montserrat, 1994).

La LLC representa el 20-30 % de las leucemias. Su curso clínico es extremadamente heterogéneo, pudiendo mostrar desde un comportamiento completamente indolente hasta progresar en un breve periodo de tiempo. La LLC sigue siendo una enfermedad incurable. La mediana de edad al diagnóstico es de 72 años, apareciendo únicamente en un 27 % de pacientes con edades inferiores a los 55 años. La incidencia global de la enfermedad es de 4 pacientes por cada 100.000 habitantes por año (5.6 pacientes por cada 100.000 hombres y 2.8 pacientes por cada 100.000 mujeres), siendo más frecuente en individuos del sexo masculino. Existe una menor incidencia de esta hemopatía en individuos de raza negra y asiática frente a los individuos de raza blanca, a pesar de residir en las mismas regiones geográficas, estas diferencias se justificarían por un componente genético de la enfermedad (Omoti y cols., 2007; Gunawardana y cols., 2008; Ries y cols., 2008).

## Introducción

### 1.1.- Etiopatogenia

El origen celular de la LLC todavía se desconoce, pero los estudios actuales tratan de esclarecerlo. Históricamente se pensaba que la LLC se debía a la acumulación de linfocitos B que no habían pasado por el centro germinal, o bien linfocitos vírgenes circulantes u originados en el manto folicular.

El desarrollo de las células B de memoria normales consiste en la migración de los linfocitos vírgenes que presentan inmunoglobulinas (Igs) en su superficie hasta la periferia y los órganos linfoides secundarios. Es en los centros germinales de los folículos linfoides donde entran en contacto con antígenos. Tras ese encuentro antigénico, los linfocitos B madurarán con la ayuda de células T y células presentadoras de antígeno, apareciendo mutaciones somáticas al azar en los genes de las Igs. Únicamente aquellas células B cuyo anticuerpo posea una alta afinidad frente al antígeno que han reconocido sobrevivirán y pasarán a formar parte del repertorio de células de memoria necesario en la respuesta inmune secundaria. Por lo tanto, el mecanismo de mutación somática puede evitar el proceso apoptótico. Diversos estudios sugieren que el proceso de mutación somática puede ser independiente de células T y llevarse a cabo fuera de los centros germinales (William y *cols.*, 2002).

La hipótesis inicial especulaba sobre si los linfocitos de la LLC tenían como homólogos normales a los linfocitos vírgenes. Esta teoría se cuestionó cuando se observó que el 50-70 % de los pacientes afectados de LLC presentaban mutaciones somáticas en las Igs que forman parte de los receptores de células B (BCR) (Schroeder y Dighiero, 1994; Fais y *cols.*, 1998). A partir de ese hallazgo se estableció la teoría del doble origen de los linfocitos de la LLC y los estudios se centraron en el análisis de las posibles diferencias clínicas entre ambos grupos. En 1999 dos grupos independientes de investigadores sugirieron al mismo tiempo que los casos de LLC sin mutaciones en la región variable de las Igs (*IGHV*) presentaban un peor curso clínico en comparación con los casos mutados, y propusieron que el curso clínico variable entre ambos grupos se debía a un origen celular distinto (Caligaris-Cappio y Hamblin, 1999; Damle y *cols.*, 1999). Las células de los casos no mutados podrían derivar de las células linfoides B vírgenes y las células de los mutados de las células B de memoria. Esta idea se sustituyó en 2001 cuando los perfiles de expresión génica de ambos grupos de pacientes demostraron que ambos compartían un fenotipo homogéneo, independientemente de la presencia/ausencia de mutaciones en los genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas (*IGHV*) (Klein y *cols.*, 2001; Rosenwald y *cols.*, 2001).



Actualmente, los estudios realizados apuntan al papel del receptor de células B (BCR) en la variabilidad clínica de los pacientes afectados de LLC. El BCR es un complejo multimérico formado por la unión de una Ig de superficie y un heterodímero Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  unidos de forma no covalente. La baja expresión de este receptor es una de las características de las células de la LLC.

Los estudios moleculares del repertorio de genes de la cadena pesada de inmunoglobulinas demuestran que la LLC se caracteriza por presentar un uso preferencial de determinados genes de *IGHV*, representados principalmente por *IGHV1-69*, *IGHV4-34*, *IGHV3-7*, *IGHV3-23*. El uso de estos genes es muy restringido y sesgado, en comparación al repertorio de genes de *IGHV* utilizados por los linfocitos B de un adulto sano.

Existen diferencias en la transducción de señales a través del BCR entre los casos de LLC no mutados respecto a los casos de LLC mutados. En los casos con LLC no mutados, con un peor pronóstico asociado, la estimulación antigénica podría contribuir a la mayor tasa de supervivencia y crecimiento de las células de la LLC mediado por los receptores BCR, teniendo como consecuencia final la expansión clonal de dichas células. Por otro lado, los casos con un pronóstico favorable serían aquellos que en presencia de ciertos antígenos entrasen sus células leucémicas en anergia, en la cual los linfocitos no son activos (Melchers y Rolink, 2006; Apollonio y *co/s.*, 2013; Woyach, 2013).

Por lo que se refiere a la presencia de receptores de células B estereotipados (es decir, receptores muy similares, casi idénticos, en las secuencias de las regiones CDR3 de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas), estos se hallan en más de un 30 % de LLC. Así pues, existe la teoría de que con una elevada probabilidad, los clones de LLC son seleccionados por la presencia de un antígeno.

Los autoantígenos, antígenos implicados en la transformación de la LLC están por determinar. La clonación y expresión de anticuerpos de células de LLC no mutados y LLC mutados ha mostrado que los anticuerpos recombinantes de células de LLC-NM reaccionan con lisados celulares tales como ADN, insulina y lipopolisacáridos (LPS), pudiéndolos clasificar como polireactivos. Sin embargo, los anticuerpos recombinantes de los casos de LLC-M no muestran esta polireactividad. Por lo tanto, las diferencias reactivas entre ambos grupos de pacientes podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad (Hervé y *co/s.*, 2005).

La LLC siempre ha sido considerada como un proceso acumulativo más que proliferativo, y con una débil respuesta a los estímulos exógenos. Más de un 99 % de los linfocitos B circulantes están en la fase Go/G1 temprana (Caligaris-Cappio y Hamblin,

## **Introducción**

1999). Se sabe que las células leucémicas presentes en la LLC expresan marcadores de activación celular y contienen mRNAs para una amplia variedad de citoquinas (Damle y *cols.*, 2002). Todo esto lleva a pensar que las células homólogas a las patológicas de la LLC son células B con experiencia antigénica, apoyando de nuevo la importancia del receptor BCR en la etiopatogenia de la enfermedad.

Por otra parte, el acortamiento de los telómeros es indicador de que las células leucémicas han sufrido varias divisiones celulares antes de sufrir la transformación leucémica. La expresión de la enzima telomerasa es considerada indicadora de proliferación más que como marcador tumoral. La proliferación de las células cancerosas tiene lugar en los denominados centros proliferativos. Los mecanismos que llevan a la aparición de estos centros se desconoce pero su formación es característica de las células de la LLC, dado que no se han observado en ninguna otra patología donde se vean implicadas las células B. Sin embargo, este tipo de centros proliferativos también se han descrito en la artritis reumatoide y en la esclerosis múltiple reforzando el papel de la estimulación antigénica en su origen y la interrelación de la LLC y los procesos autoinmunes.

Históricamente se consideraba una patología donde las células leucémicas tenían inhibida la apoptosis. Actualmente y gracias a estudios sobre los perfiles de expresión génica, se ha observado un aumento de expresión en genes implicados en la regulación del ciclo celular y progresión del mismo (Messmer y *cols.*, 2005). Mediante un método de marcaje isotópico estable a muestras de pacientes afectados se ha demostrado el dinamismo de la LLC, presentando una tasa de crecimiento de 0.1 % a > 1 % de la clona leucémica por día (Messmer y *cols.*, 2005).

Los estudios realizados recientemente por CATERA y colaboradores sugieren que los anticuerpos presentes en las células neoplásicas de la LLC reaccionan con autoantígenos asociados a la apoptosis celular y a la peroxidación lipídica y proteica que ocurre durante la muerte celular programada (CATERA y *cols.*, 2008). Aproximadamente un 60 % de estos anticuerpos reaccionan de forma selectiva con linfocitos apoptóticos y no con los viables. Por lo tanto, la apoptosis celular parece tener un papel en la selección y expansión celular en la LLC (CATERA y *cols.*, 2008).

### **1.2.- Diagnóstico y estadios clínicos**

La mayor parte de los pacientes son diagnosticados de forma casual en analíticas de rutina donde aparece una leucocitosis con linfocitosis absoluta. Los pacientes pueden presentar alguno de los siguientes síntomas: astenia, adenopatías generalizadas,

sudoraciones nocturnas y/o pérdida de peso. En muchos casos los pacientes han padecido infecciones recurrentes causadas por su hipogammaglobulinemia (disminución en la tasa de Igs).

El correcto diagnóstico de la enfermedad requiere de unos requisitos mínimos que se propusieron por parte del *International Workshop on CLL* (IWCLL) (1989) y del *National Cancer Institute-Sponsored Working Group* (NCI-WG) (Cheson y cols., 1996). Estos requisitos han sido revisados recientemente por el IWCLL y se resumen a continuación (Hallek y cols., 2008):

- Presencia de  $>5 \times 10^9/L$  linfocitos B en sangre periférica mantenida como mínimo tres meses.
- Clonalidad de los linfocitos B demostrada por estudio inmunofenotípico.
- Linfocitosis constituida por linfocitos pequeños de aspecto maduro, escaso citoplasma, núcleo denso sin nucléolos evidentes y con cromatina cuarteada (LLC con morfología típica). En la extensión se acostumbra a observar las típicas sombras nucleares o de Gumpecht. A parte de la forma típica, se reconocen otras dos formas morfológicas atípicas: la LLC/PL, que se caracteriza por un porcentaje de prolinfocitos superior al 10 % e inferior al 55 %, y la forma celular mixta, caracterizada por la presencia de más de un 15 % de células grandes o atípicas, células hendidas o prolinfocitos.
- Inmunofenotipo típico:  $CD5^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD23^+$ ,  $CD20^{+débil}$ ,  $CD22^{+débil}$ ,  $IgS^{+débil}$ ,  $CD79^{+débil}$  y FMC7. Cuando las células presenten un perfil antigénico atípico, el inmunofenotipo debe completarse con pruebas complementarias para el diagnóstico diferencial.
- Cuando la cantidad de linfocitos B clonales es  $<5 \times 10^9/L$ , y no existen ni linfadenopatías u organomegalias, citopenias o sintomatología B, el diagnóstico es de **linfocitosis B monoclonal (LBM)**. La tasa de progresión de la LBM a LLC es de 1-2 % por año.

Al diagnóstico, tanto el aspirado como la biopsia de la médula ósea pueden presentar una celularidad normal o elevada, con una infiltración por linfocitos superior al 30 %.

El patrón de infiltración de la médula ósea puede ser: nodular, intersticial, mixto y difuso (Hernández-Nieto y cols., 1977). El patrón nodular consiste en una infiltración por nódulos linfoides con conservación de la grasa y celularidad hematopoyética normal; a diferencia de lo que ocurre en los linfomas foliculares, en la LLC-B los nódulos no se sitúan junto a las trabéculas óseas. El patrón intersticial presenta una infiltración linfocitaria intersticial, con celularidad hematopoyética y adiposa conservada. El patrón

## Introducción

mixto consiste en una combinación de los patrones nodular e intersticial. Finalmente, en el patrón difuso casi no se observa celularidad hematopoyética ni grasa debido a la existencia de una gran infiltración de linfocitos.

Los patrones nodular, intersticial y mixto se observan en las fases iniciales de la enfermedad y el difuso en las más avanzadas (Montserrat y cols., 1998).

Los ganglios linfáticos también muestran una infiltración difusa por linfocitos de pequeño tamaño. Al lado de los linfocitos de aspecto maduro pueden observarse otros de aspecto atípico. Lennert en 1978 distingue tres patrones histopatológicos:

1. Difuso: infiltración prácticamente absoluta por linfocitos pequeños.
2. Pseudofolicular: existencia de agregados celulares formados por prolinfocitos y parainmunoblastos, que aparecen como centros claros en el corte histológico.
3. Tumoral: presenta amplias zonas del ganglio linfático infiltradas por abundantes linfocitos atípicos.

En el bazo la infiltración puede ocupar la pulpa blanca en forma de nódulos linfoides, sin centro claro reactivo. La pulpa roja también puede ser infiltrada. En las fases más avanzadas de la enfermedad puede haber infiltración de los sinusoides esplénicos y de los cordones medulares (Lennert, 1978; Lampert IA, 1988).

En ocasiones, los pacientes presentan anemia o crecimiento de los nódulos linfáticos. La hepatomegalia, y con más frecuencia la esplenomegalia, son signos físicos característicos en la mitad de los casos. La esplenomegalia sin linfadenopatía es rara (< 5 % de los casos) y constituye la *forma esplénica* de la enfermedad, la cual se asocia a un buen pronóstico del paciente (Catovsky y cols., 1989).

De manera excepcional, se pueden detectar infiltraciones linfoides en diferentes tejidos: piel, riñón, glándulas salivales o lagrimales, pulmón u otros. En estos casos es necesario descartar otra neoplasia o progresión de la enfermedad a linfoma.

En un 20 % de los casos se detecta anemia (Hb<11g/dl) o trombocitopenia (recuento de plaquetas < 100 x 10<sup>9</sup>/L). Además, un 10-25 % de los pacientes desarrollan anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que a veces se pone de manifiesto al inicio del tratamiento. Por otro lado, un 5 % de los casos presenta un componente monoclonal, normalmente IgM (Pangalis y cols., 1988).

Los pacientes de LLC se clasifican según los estadios clínicos que establecieron Rai (Rai y cols., 1975) y Binet (Binet y cols., 1981). El *International Workshop on CLL* (2008) recomienda emplearlos de forma combinada (Hallek y cols., 2008) (Tabla 1).

### 1.3.- Alteraciones citogenéticas

Los primeros estudios donde se describe la presencia de alteraciones cromosómicas en la LLC fueron sobre la década de los años 70. La gran limitación del empleo de la citogenética convencional en esta patología se debe al bajo índice mitótico de las células leucémicas *in vitro*, y a que la mayor parte de las metafases analizadas pertenecen a clones celulares normales. El desarrollo de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) entre finales de los años 80 y principio de los 90, permitió una detección más sensible de las anomalías cromosómicas en las células leucémicas, debido a que el análisis se realiza en núcleos en interfase. Fue entonces cuando se estableció una estratificación de los pacientes según riesgo, y gracias a su uso se han detectado anomalías genéticas en más de un 80% de los casos (Döhner y cols., 2000), aunque estudios recientes han descrito lesiones genéticas en todos los pacientes de LLC gracias al empleo de arrays de CGH de alta resolución (Grubor y cols., 2009).

**Tabla 1.-** Estadios clínicos y sistemas pronóstico en la LLC según Rai y Binet.

Sistemas pronóstico	Estadio **	Características clínicas	Mediana de Supervivencia (meses)
<b>RAI</b>			
Riesgo bajo	0	Linfocitosis	> 120
Riesgo moderado	I	Linfocitosis, adenopatías	85
	II	Linfocitosis, esplenomegalia y/o hepatomegalia	60
	III	Linfocitosis, anemia (Hb < 11g/dL)	24
Riesgo alto	IV	Linfocitosis, plaquetopenia (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /L)	24
<b>BINET</b>			
	A	No anemia ni plaquetopenia, < 3 áreas linfoides * aumentadas de tamaño	> 120
	B	No anemia ni plaquetopenia, ≥ 3 áreas linfoides aumentadas de tamaño	50
	C	Anemia (Hb < 10 g/dL) o plaquetopenia (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> / L)	24

\* En el sistema pronóstico de Binet (Binet y cols., 1981) se consideran las siguientes áreas linfoides: adenopatías (tanto uni como bilaterales) en cuello, axilas e ingles; bazo e hígado.

\*\* El International Workshop on CLL (2008) recomienda integrar la clasificación de Binet y Rai (Rai y cols., 1975) de la siguiente forma: A(0), A(I), A (II); B(I), B(II) y C(III), C(IV).

De manera convencional, las células de la LLC se estimulaban *in vitro* mediante mitógenos de células B típicos como son el mitógeno pokeweed (PWM), el 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA), y lipopolisacáridos, detectando así alteraciones cromosómicas en sólo el 40-50 % de los casos (Gahrton y cols., 1980; Juliusson y cols., 1990; Geisler y cols., 1997). Con el fin de aumentar la detección de

## Introducción

clones con alteraciones cromosómicas se han introducido nuevos estimulantes tales como el CD40-ligando y el CpG-oligodeoxynucleotido (ODN). Son cadenas cortas de ADN sintéticas o de origen bacteriano, normalmente de entre 19-25 bases, con los motivos CpG no metilados. La estimulación de las células de la LLC mediante CpG-DSP30 más interleukina 2 (IL2) ha permitido la detección de cariotipos anormales en más del 80 % de los casos (Buhmann y cols., 2002; Dicker y cols., 2006; Haferlach y cols., 2007; Heerema y cols., 2010; Kotkowska y cols., 2011). Las alteraciones detectadas coinciden con los resultados obtenidos por FISH, sugiriendo que el CpG-ODN no inducen alteraciones citogenéticas *in vitro*. A su vez, se ha visto que entre el 25-37 % de los pacientes que no presentaban ninguna de las alteraciones del panel estándar de FISH, sí que eran portadores de otras alteraciones genéticas (Haferlach y cols., 2007; Rigolin y cols., 2012). Estas nuevas alteraciones no presentan ninguna correlación con factores pronósticos como CD38, ZAP-70 o el estado mutacional de *IGHV*, pero sí se correlacionan con estados avanzados de la enfermedad con tiempos de supervivencia libre de tratamiento y supervivencia global más cortos (Rigolin y cols., 2012).

La leucemia linfática crónica, entre otras neoplasias hematológicas, aparece con una frecuencia siete veces superior de la esperada en familiares de primer grado de pacientes diagnosticados de LLC (Cuttner, 1992; Yuille y cols., 1998). A pesar de que no se han hallado pruebas de transmisión genética de esta patología, ciertos polimorfismos génicos parecen predisponer a los pacientes a padecer algún tipo de cáncer familiar, incluida la LLC (Calin y cols., 2005; Novak y cols., 2006).

Las alteraciones cromosómicas más comunes en la LLC se describen a continuación:

- **Anomalías del cromosoma 13**

La deleción que afecta al brazo largo del cromosoma 13 (del13q14) es la alteración citogenética más frecuente en la LLC, presentándola aproximadamente un 55 % de los pacientes (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007). Generalmente está asociada con un buen pronóstico del paciente cuando se presenta como única alteración (Döhner y cols., 2000). Aunque, estudios recientes han demostrado que los pacientes con altos porcentajes de células portadoras de dicha deleción presentan un curso clínico más agresivo (Hernández y cols., 2009; Van Dyke y cols., 2010; Dal Bo y cols., 2011). En el 70 % de los casos delecionados, la deleción afecta sólo a uno de los alelos (monoalélica), un 15 % es bialélica y un 15 % la presentan en mosaicismo (Reddy, 2006; Puiggros y cols., 2013). La deleciones bialélicas estudiadas son pequeñas y no incluyen al gen RB1 (Ouillette y cols., 2008) aunque existe una gran controversia respecto al impacto que

tiene en los pacientes portadores. Por una parte se hipotetiza con el hecho de que son el resultado de una evolución de la pérdida monoalélica, por lo tanto presenta una mayor agresividad, mientras que otros investigadores no encuentran diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes (Dewald *y cols.*, 2003; Chena *y cols.*, 2008; Van Dyke *y cols.*, 2010; Dal Bo *y cols.*, 2011; Garg *y cols.*, 2012; Orlandi *y cols.*, 2013; Puiggros *y cols.*, 2013). Cuando la del(13q) aparece como única alteración se asocia a un pronóstico favorable, presentando una supervivencia global superior a los pacientes con cariotipo normal (Döhner *y cols.*, 2000). La mediana de supervivencia de los pacientes con del(13q) es de 133 meses (Döhner *y cols.*, 2000).

Recientemente, el grupo de Hernández *y cols* ha demostrado que el número de células portadoras de la deleción 13q influye en el pronóstico de los pacientes. En este estudio, el grupo formado por los pacientes portadores de  $\geq 80$  % de células delecionadas presenta una supervivencia similar a aquellos con del(11q) y del(17p), patrones de infiltración difusos de la médula ósea, recuentos linfocitarios elevados y esplenomegalias. Por su parte, los pacientes con menor proporción de células delecionadas presentan una supervivencia similar a los pacientes con cariotipo normal o trisomía 12. Por lo tanto, el grupo portador de la del(13q) no es homogéneo como se pensaba hasta la fecha. El punto de corte del grupo de mal pronóstico oscila entre el 65,5 y el 80 % (Hernández *y cols.*, 2009; Van Dyke *y cols.*, 2010; Dal Bo *y cols.*, 2011; Orlandi *y cols.*, 2013).

La heterogeneidad que presenta este grupo de pacientes también se ha analizado mediante perfiles de expresión génica y análisis de miRNA, clasificando los pacientes en portadores de una deleción pequeña o deleción bialélica, o bien en portadores de deleciones de mayor tamaño o deleción monoalélica. Los pacientes con grandes regiones delecionadas tienen disminuida la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular e inhibición de apoptosis, y sin embargo, presentan un aumento de la expresión de genes implicados en la motilidad celular, adhesión, regulación de la proliferación celular, migración de células tumorales, metastasis, angiogénesis y apoptosis, mostrando por lo tanto, un curso clínico más agresivo (Hernández *y cols.*, 2009; Rodríguez *y cols.*, 2012).

Esta deleción también aparece en otros tipos de cáncer como el linfoma del manto (50 %), el mieloma múltiple (30 %), el cáncer de próstata (60 %) y en tumores pituitarios. Todos estos cánceres tienen una región común mínima sugiriendo un papel patogénico del gen(es) delecionado(s) (Ng *y cols.*, 2007; Nicoloso *y cols.*, 2007).

## Introducción

Se han descrito dos tipos de microRNAs, miR-15a y miR-16-1 en la región 13q14.3 con función supresora de tumores en la LLC (Calin y *cols.*, 2002). Los microRNAs son pequeños RNAs (15-25 pb) no codificantes que modulan la expresión de genes a nivel postranscripcional. Tanto miR-15a como miR-16-1 son expresados por los linfocitos B normales CD5+ en altos niveles; por lo que se les asocia un papel importante en la homeostasis de este tipo celular. La expresión de ambos microRNAs está disminuida o ausente en la mayoría de los casos de LLC (70 %). Este descenso en los niveles de expresión de miR-15a y miR-16-1 se asocia a una sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 evitando así la apoptosis y favoreciendo la supervivencia de las células de la LLC (Calin y *cols.*, 2002; Cimmino y *cols.*, 2005). Otros genes localizados en 13q, como *DLEU7*, podrían cooperar en la actividad supresora de tumores. Si las deleciones son de gran tamaño e incluyen al gen *RB1*, disminuye tanto el tiempo hasta el primer tratamiento como la supervivencia global cuando se les compara con el grupo de pacientes con afectación de miR-15a y miR-16-1 (Ouillette y *cols.*, 2008, 2011; Mosca y *cols.*, 2010; Parker y *cols.*, 2011).

La LLC familiar presenta la deleción 13q14 en el 85 % frente al 55 % de pacientes de LLC que la presentan de forma esporádica. La región 13q21.33-q22.2 parece asociarse a la predisposición de padecer LLC familiar y LBM (Ng y *cols.*, 2007).

- **Anomalías cromosoma 12**

La trisomía 12 es la segunda alteración más frecuente entre los pacientes con LLC, detectándose mediante FISH aproximadamente en un 15 % de los pacientes (Döhner y *cols.*, 2000; Haferlach y *cols.*, 2007). Recientemente se han asociado las mutaciones del gen *NOTCH1* a pacientes con trisomía 12, especialmente en aquellos grupos con mal pronóstico (genes *IGHV* no mutados y/o *ZAP70* +). La alta frecuencia de estas mutaciones podría explicar el mal pronóstico de un subgrupo de pacientes con trisomía 12 y la heterogeneidad del curso clínico de dichos pacientes (Gattei y *cols.*, 2008; Quijano y *cols.*, 2008; Balatti y *cols.*, 2012; Puiggros y *cols.*, 2014). Los estudios realizados empleando análisis de fragmentos de restricción, revelan que las células con trisomía 12 duplican uno de sus cromosomas y retienen al homólogo (Crossen y Horn, 1987; Einhorn y *cols.*, 1989). Rodríguez y colaboradores en 2008 publicó que entre los portadores de trisomía 12, la ganancia de material no afecta a todo el cromosoma sino a la región 12q12-q24 donde se localizan los genes *LEMD3*, *CAND1*, *MARS* y *DIRK4* implicados en proliferación celular, transcripción y control del ciclo celular respectivamente, los cuales se encuentran sobreexpresados según técnicas de *arrays*, lo que confirma un efecto de



dosis génica (Haslinger y cols., 2004). En estas regiones residen además varios oncogenes responsables del ciclo celular como *P27*, *MDM-2*, *CDK4*, *HIP1R* y *MYF6* que también se sobreexpresan en los pacientes con trisomía 12 (Kienle y cols., 2005; Porpaczy y cols., 2009).

Las células leucémicas con trisomía 12 se acompañan con frecuencia otras anomalías complejas. Suelen asociarse con una morfología atípica y/o prolinfocítica y suelen presentarse con mayor frecuencia en casos de LLC no mutados. La trisomía 12, es frecuente en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y con altos índices de proliferación celular y linfadenopatía marcada (Cuneo y cols., 1992; Que y cols., 1993; Hernández y cols., 1995; García-Marco y cols., 1996; Matutes y cols., 1996; Döhner y cols., 2000). Respecto a su caracterización inmunofenotípica, los casos con trisomía 12 presentan un fenotipo atípico con una expresión intensa de inmunoglobulinas de membrana (slg) y CD20, ausencia de expresión de CD23 y expresión de marcadores poco frecuentes como el FMC7.

El grupo de Buhl en 2004, identificó un nuevo gen, el *CLLU1* localizado en 12q22. Su sobreexpresión confiere mal pronóstico y se asocia a células con las *IGHV* no mutadas siendo independiente de la presencia/ausencia de trisomía 12 o translocaciones en 12q22. (Buhl y cols., 2006).

La mediana de supervivencia de los pacientes que presentan trisomía 12 es de 114 meses (Döhner y cols., 2000).

### • **Anomalías cromosoma 11**

La deleción del brazo largo del cromosoma 11, concretamente la región 11q22-23, se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad y aparece en un 12-18 % de los pacientes con LLC (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007).

El gen supresor de tumores *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) se encuentra localizado en 11q22-23 pero no todos los casos con deleción 11q presentan el gen mutado, por lo que otros genes deben estar implicados en la patobiología de estos pacientes (Stilgenbauer y cols., 1996; Döhner y cols., 1997; Karhu y cols., 1997; Schaffner y cols., 1999; Zhu y cols., 1999). El gen *ATM* codifica para una proteína que actúa en la ruta de *TP53* en respuesta al daño celular, por lo tanto, su mutación o deleción tendrá efectos sobre la apoptosis mediada por esta ruta de señalización. La del(11q) se asocia a resistencia al tratamiento quimioterápico convencional, y aquellos casos en los que se pierden ambas copias del gen o las presentan mutadas, muestran

## Introducción

una peor respuesta a la irradiación y a la exposición de drogas citotóxicas, y por tanto, una peor supervivencia global (Austen y cols., 2007).

La deleción 11q es una alteración primaria ya que se detecta en el momento del diagnóstico. Los pacientes portadores suelen ser más jóvenes (<55 años) y presentan estados avanzados de la enfermedad, un mayor grado de linfadenopatía y una mediana de supervivencia de 79 meses (Fegan y cols., 1995; Döhner y cols., 1997, 2000; Stilgenbauer y cols., 2000). La expresión de moléculas de adhesión está reducida en pacientes con 11q- (Sembries y cols., 1999).

Otros genes incluidos en la mínima región delecionada, de 11q22.3 a 11q23.1 son *RDX*, *FRDX1*, *RAB39*, *CUL5*, *ACAT*, *NPAT*, *KDELC2*, *EXPH2*, *MRE11*, *H2AX* y *BIRC3*. El gen *BIRC3* se ha descrito en un 24 % de los pacientes refractarios a fludarabina (Rossi y cols., 2012).

Estudios realizados mediante arrays han revelado que existe una minoría de pacientes portadores de la deleción 11q que no engloba el gen *ATM* (Gunn y cols., 2009).

- **Anomalías cromosoma 17**

La deleción 17p se detecta aproximadamente entre un 3-8 % de los pacientes con LLC abarcando la región 17p10-p11.2 (Döhner y cols., 2000; Delgado y cols., 2012). Los pacientes portadores de del(17p) son clasificados en el grupo de mal pronóstico, aunque estudios recientes han demostrado que existe una gran heterogeneidad en este grupo de pacientes según el momento de aparición de la deleción. Los pacientes con la del(17p) *de novo* (2-4 %) muestran una mediana de supervivencia entre 4-5 años respecto a los pacientes con la deleción adquirida durante la evolución clonal, particularmente en pacientes que han recibido tratamiento, cuya mediana de supervivencia oscila entre 1-1,5 años (Tam y cols., 2009). El porcentaje de núcleos con la deleción 17p es importante a la hora de establecer subgrupos de riesgo, estableciéndose el punto de corte en el 25 % de los núcleos analizados (Catovsky y cols., 2007; Tam y cols., 2009; Oscier y cols., 2010; Delgado y cols., 2012). Los pacientes con del(17p) suelen presentar un inmunofenotipo atípico y también se han asociado a un aumento en la expresión de CD38, ZAP-70 e *IGHV* no mutada, confiriéndoles un mal pronóstico (Krober, 2006; Quijano y cols., 2008; Rassenti y cols., 2008).

La mutación del gen *TP53*, localizado en 17p13.1, se ha detectado en un 5-10 % de los casos de LLC-B mediante técnicas moleculares (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007). Las mutaciones o anomalías de este gen desempeñan probablemente un papel patogénico en casi la mitad de los cánceres humanos. Dicho gen codifica para una

fosfoproteína p53, la cual tiene un papel central en la regulación del ciclo celular, en la reparación del ADN y en la apoptosis frente a situaciones de estrés o daño celular (Mowat, 1998; Bargonetti y Manfredi, 2002). Estas mutaciones suelen estar presentes en el alelo no delecionado en pacientes con del(17p) en un 75 % de los casos, en contraste con la baja proporción de pacientes portadores de la mutación sin delección en 17p. Esto puede deberse a una selección de las células portadoras de una inactivación bialélica de *TP53* (Zenz y cols., 2008). La mutación de *TP53*, acompañada o no por 17p-, es un factor pronóstico independiente y se asocia a una menor supervivencia global (32 meses) y menor tiempo libre de progresión, resistencia al tratamiento quimioterápico convencional y transformación a síndrome de Richter (Döhner y cols., 2000; Zenz, Benner, y cols., 2008; Zenz y cols., 2010).

Los pacientes portadores de del(17p) y/o mutación de *TP53* no responden a los tratamientos estándar basados en fludarabina-ciclofosfamida-rituximab establecidos para los pacientes con LLC. Por lo tanto deben seguirse otras líneas de tratamiento como el Ibrutinib que es un inhibidor de la tirosina kinasa de Bruton (BTK) y fármacos independientes de p53. Para pacientes en remisión completa se recomienda el trasplante alogénico de células madre (Jain y O'Brien, 2012; Jain y cols., 2015).

La disfunción del factor nuclear p53 puede deberse a la sobreexpresión del gen *MDM2*, una ubiquitina ligasa específica de p53 encargada de la degradación de p53 y que se encuentra sobreexpresada en un 50-70 % de los pacientes (Koníková y Kusenda, 2003). La inactivación del gen *ATM* también puede provocar un mal funcionamiento en la ruta de p53 (Pettitt y cols., 2001).

- **Otras anomalías cromosómicas**

Existen otras alteraciones cromosómicas que aparecen con menor frecuencia, como las que afectan a los cromosomas 6 y 14.

- Cromosoma 6: La delección del brazo largo del cromosoma 6 se ha identificado en un 2-9 % de los pacientes y la mayoría suelen afectar a la banda 6q21. Es una de las alteraciones más comunes en las neoplasias de origen linfóide. En dicha región, se han identificado una serie de genes, ninguno de los cuales parece desempeñar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. No se le asocia mal pronóstico. Mediante *arrays* se ha visto que esta alteración aparece entre un 3-17 %, observando también que en este grupo de pacientes existe una gran heterogeneidad y no se ha podido establecer una región mínima delecionada (MDR) (Chapiro y cols., 2010; O'Malley y cols., 2011; Edelman y cols., 2012; Puiggros y cols., 2014). El grupo de Edelman y colaboradores

## Introducción

describen una región de 2,5 Mb en 6q21 que afecta al 80 % de los pacientes pero no han podido establecer un gen diana (Edelmann y cols., 2012).

– Translocaciones cromosómicas: La LLC no se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas, a pesar de ello, aparecen entre un 32-42 % de los casos y el pronóstico de este grupo de pacientes depende de la complejidad del cariotipo, los cromosomas implicados y si éstas son equilibradas o no (Mayr y cols., 2006; Van Den Neste y cols., 2007; Cavazzini y cols., 2008; Baliakas y cols., 2014; Puiggros y cols., 2014).

Las translocaciones que afectan al cromosoma 14 aparecen con una incidencia del 4-9 % siendo las más frecuentes:

- t(14;19)(q32;q13): Los genes implicados son *IGHV* y *BCL3*, y está asociada a trisomía 12, cariotipos complejos, *IGHV* no mutado, morfología atípica y mal pronóstico (Huh y cols., 2011).

- t(14;18)(q32;q21): Esta translocación implica al gen *BCL2*, existiendo controversia a cerca de su papel pronóstico. Cavazzini y colaboradores describen una menor supervivencia de dicho grupo de pacientes contrariamente a lo publicado por el grupo de Put (Cavazzini y cols., 2008; Put y cols., 2009).

– Cariotipos complejos: Un cariotipo complejo es aquel que posee tres o más alteraciones cromosómicas, se detectan en aproximadamente un 16 % de los pacientes (Haferlach y cols., 2007; Baliakas y cols., 2014) y se asocia a estados no mutados de *IGHV* y expresión de CD38 (Haferlach y cols., 2007). Los cariotipos complejos tienen valor pronóstico ya que predicen tiempos libres de tratamiento así como supervivencia global cortos en pacientes con LLC tratados. Se ha descrito una asociación significativa entre los cariotipos complejos y las deleciones de 11q y 17p (Haferlach y cols., 2007; Jaglowski y cols., 2012). El grupo de Ouillette ha demostrado que la complejidad genómica de la LLC es debida a la rotura de la doble hebra de ADN como respuesta a los defectos de múltiples genes incluidos *TP53*, *ATM* y otros genes localizados en 11q o por el gen *RB1* localizado en 13q14 (Ouillette y cols., 2010; Puiggros y cols., 2014). Muchas alteraciones citogenéticas pueden adquirirse durante el curso de la enfermedad (evolución clonal) (Ouillette y cols., 2013).

- **Alteraciones citogenéticas detectadas mediante arrays**

La tecnología de los microarrays se emplea para la detección de nuevas alteraciones cromosómicas asociadas a la LLC, aportando información adicional sobre las alteraciones presentes en el genoma de los pacientes (Rodríguez-Vicente y cols.,

2013). Varios estudios han demostrado la presencia de alteraciones citogenéticas nuevas, crípticas y cambios recurrentes como la ganancia de 2p y las deleciones de 8p, 18q y 22q.

✓ Cromosoma 2: El gen *MYCN* se localiza en 2p24.3 y se han descrito ganancias de material en esa región y por consiguiente un aumento del transcrito, sugiriendo un papel patogénico (Schwaenen y cols., 2004). Se han descrito otros genes como *REL* y *MSH2* afectados por las ganancias en 2p24.3. El 28 % de los pacientes no tratados en estadio B/C presentan ganancias en 2p y muestran un menor supervivencia y un riesgo alto de transformación a Síndrome de Richter (Chapiro y cols., 2010; Rinaldi y cols., 2011; Puiggros y cols., 2014).

✓ Cromosoma 8: Se han descrito tanto ganancias como pérdidas en un 2-5 % de los pacientes con LLC, asociándose a la del(17p) (Forconi y cols., 2008; Rinaldi y cols., 2011; Puiggros y cols., 2014).

✓ Cromosoma 20: El grupo de Rodríguez ha descrito una región de ganancia recurrente localizada en 20q13 en el 19 % de los pacientes con LLC, asociada con complejidad genómica (AE Rodríguez y cols., 2012).

- **Alteraciones citogenéticas detectadas mediante secuenciación masiva**

Los avances en las técnicas de secuenciación masiva (*next generation sequencing* (NGS)) han permitido identificar nuevas lesiones genéticas, como las mutaciones en los genes *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* y *MYD88* (Fabbri y cols., 2011; Puente y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Quesada y cols., 2012). Estas mutaciones podrían usarse como dianas terapéuticas o como biomarcadores en los pacientes con LLC, ya que el número de mutaciones *driver* acumuladas (0 a  $\geq 4$ ) discrimina a los pacientes con diferente comportamiento clínico (D. Rossi y cols., 2011; Davide Rossi y cols., 2011; Fabbri y cols., 2011; Puente y cols., 2011, Puente y cols., 2015; Wang y cols., 2011; Quesada y cols., 2012; Rossi y cols., 2012). Recientemente, el grupo de Puente y colaboradores han ampliado el número de mutaciones *driver*, incluyendo cambios en los genes *ZNF292*, *ZMYM3*, *ARID1A* y *PTPN11* y mutaciones en 9p13 que disminuyen la expresión del factor de transcripción específico de células B *PAX5* (Puente y cols., 2015).

✓ *NOTCH1*: Este gen se localiza en 9q34.3 y codifica para un factor de transcripción (Puiggros y cols., 2014). Este gen se encuentra mutado en aproximadamente el 10 % de los pacientes recién diagnosticados de LLC, frente al 15-20 % de los pacientes en progresión y/o recaída. La presencia de mutaciones en el gen *NOTCH1* se asocia con ausencia de mutaciones *IGHV* y trisomía 12 (Rossi y cols.,

## Introducción

2011; Fabbri y cols., 2011; Puente y cols., 2011; Balatti y cols., 2012; Del Giudice y cols., 2012). La mutación más recurrente es c7544\_7545delCT que está presente en el 77 % de los casos, y es fácilmente detectable mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los pacientes portadores de la mutación presentan tiempos de supervivencia global y de inicio de tratamiento menores, independientemente de otros factores pronósticos. Recientemente, han identificado nuevas mutaciones recurrentes en zonas no codificantes, incluyendo la región 3' del gen *NOTCH1*, que provocan *splicings* aberrantes, que aumentan la actividad de dicho gen y confieren mayor agresividad a la enfermedad (Puente y cols., 2015).

✓ *SF3B1*: Este gen se localiza en el cromosoma 2 (2p33.1) y tiene como función el control de la progresión celular y apoptosis, por lo que el reordenamiento del mismo puede provocar un aumento en la proliferación y/o supervivencia celular (Rossi y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Puiggros y cols., 2014). Aparece mutado en un 10 % de las LLC de nuevo diagnóstico y en aproximadamente en un 17 % de los pacientes en progresión o últimos estadios que requieren tratamiento (Rossi y cols., 2011; Wang y cols., 2011). Aparentemente, esta mutación se adquiere durante la evolución clonal y la población de células portadoras puede verse aumentada a lo largo de la evolución de la enfermedad independientemente de si los pacientes reciben o no tratamiento. Ser portador de la mutación está considerado un factor pronóstico independiente y conlleva un menor tiempo libre de progresión hasta que la enfermedad progresa (Oscier y cols., 2013).

✓ *BIRC3*: Las mutaciones de este gen que se localiza en 11q22.2 están asociadas con un mal pronóstico, independientemente de otros factores de riesgo (Rossi y cols., 2012; Puiggros y cols., 2014). Los portadores presentan una menor respuesta a los tratamiento con quimioterapia convencional.

✓ *MYD88*: Entre el 3-10 % de los pacientes al diagnóstico son portadores del gen mutado que se localiza en el cromosoma 8 (8q24.21).

La relevancia clínica de las mutaciones en *NOTCH1* y *SF3B1* ha sido demostrada en estudios randomizados y prospectivos (Oscier y cols., 2013; Stilgenbauer y cols., 2014), identificando a los pacientes con una supervivencia media (Oscier y cols., 2013).

Toda estas nuevas alteraciones genéticas descritas pueden ser muy útiles en el momento de estratificar a lo pacientes y comprender mejor la patogénesis de los mismos, pero en la actualidad es complicado incorporar la secuenciación masiva a la rutina clínica.

### 1.4.- Factores pronósticos

El curso clínico de los pacientes con LLC es muy heterogéneo, el rango de supervivencia oscila desde meses a varias décadas, con una mediana de 7.5 años (Dighiero y Binet, 2000).

De manera excepcional, la enfermedad puede remitir de forma espontánea; frecuentemente tras padecer una infección vírica pero sólo en menos de un 1 % (Bonvalet y cols., 1984; Seney y cols., 1986; López Guillermo y cols., 1989; Van de Castele y cols., 1994).

La heterogeneidad que presentan estos pacientes necesita de la identificación de factores pronósticos capaces de predecir el curso clínico en el momento del diagnóstico.

Los factores pronósticos clínicos tradicionales son:

- El estadio clínico según los criterios de Rai y Binet: los estadios A de Binet y los de bajo riesgo de Rai presentan un mejor pronóstico comparado con el resto de grupos.
- El tiempo de duplicación del número de linfocitos: cuando este periodo es inferior a 6 meses indica una progresión de la enfermedad.
- El patrón de infiltración en la médula ósea: el patrón difuso de infiltración se correlaciona con un peor pronóstico.

Los factores pronósticos biológicos empleados clásicamente son:

- Un porcentaje de prolinfocitos >10 % en sangre periférica es indicador de un peor pronóstico.
- Niveles elevados de  $\beta$ -2-microglobulina se asocian a un menor tiempo de supervivencia y una baja respuesta a quimioterapias convencionales.
- Niveles séricos elevados de timidinaquinasa se correlacionan con tiempos menores de supervivencia.
- Niveles séricos de CD23 soluble tienen valor en la supervivencia global y en la progresión de los pacientes en estadios A de Binet.

Actualmente existen nuevos factores pronósticos que son capaces de identificar el curso clínico de los pacientes al diagnóstico, entre los cuales cabe destacar:

- Las mutaciones somáticas en los genes *IGHV*: los pacientes con ausencia de mutaciones somáticas en *IGHV*, presentan una enfermedad más agresiva y con una

## Introducción

mediana de supervivencia inferior en comparación con los pacientes portadores de mutaciones en *IGHV* (9 años frente a más de 24 años).

- El gen *CD38* codifica para una glicoproteína de membrana tipo II de unos 45KDa. Esta molécula se expresa tanto en la superficie de algunos linfocitos B leucémicos como en los linfocitos T, NK y B normales. Sus funciones son actuar como ectoenzima catalizando la producción de metabolitos que inducen la movilización de calcio y actuar como receptor de las transducciones de señales al interior celular y en la adhesión de leucocitos al endotelio. La expresión de CD38 varía a lo largo del curso de la enfermedad (Chevallier y cols., 2002) y según la localización y tejido analizado. Los nódulos linfoides y la médula ósea presentan niveles superiores que en sangre periférica. Estudios recientes indican que CD38 no puede considerarse un factor pronóstico independiente del estado mutacional de *IGHV* o ZAP-70, pero nos proporciona información adicional. Una expresión  $\geq 30\%$  implica pronóstico adverso .

- La utilidad del gen codificante de la proteína ZAP-70 se descubrió durante el estudio de los perfiles génicos de los pacientes con *IGHV* mutado y no mutado. El gen que codifica a ZAP-70 se localiza en el brazo largo del cromosoma 2, en la banda q11.2 (Rosenwald y cols., 2001). La expresión de la proteína ZAP-70 se asocia a los casos no mutados de *IGHV*, pero estudios recientes le dan un valor pronóstico por si misma, incluso se la considera mejor indicador de la evolución de los pacientes que el propio estado mutacional, cuando se cuantifica el tiempo que transcurre entre el diagnóstico y la necesidad de tratamiento. Los linfocitos T y NK son los que expresan la molécula en mayor proporción y es en esas células donde ZAP-70 realiza funciones de activación y proliferación celular tras la estimulación. La proteína ZAP-70 contribuye en la señalización del receptor de células B de las células de la LLC, por el cual es reclutada. También actúa en la activación de otras moléculas de señalización celular que intervienen en la activación y/o supervivencia de las células B.

Los principales problemas surgidos a partir de los primeros estudios sobre la importancia de la expresión de ZAP-70 en la LLC fueron tanto las dificultades técnicas de medición de la molécula como la estandarización del método en los laboratorios. Debido a que la molécula se expresa intracitoplasmáticamente, la técnica más empleada por los analistas para su detección es la citometría de flujo, ya que con este método no es necesaria la separación celular. Un caso se considera ZAP-70 positivo cuando el porcentaje de células de la LLC que expresan la molécula es superior al 20 % (Rassenti y cols., 2004).



- Alteraciones cromosómicas: La presencia de alteraciones cromosómicas en más del 80 % de los pacientes con LLC y su valor pronóstico demostrado ha provocado que su estudio se incorporase a la rutina clínica. Las alteraciones genéticas con peor pronóstico son deleciones que afectan a los genes *TP53* (17p13) y *ATM* (11q22-23) (Döhner y cols., 2000).

- Genes de implicación pronóstica: Los perfiles de expresión génica han propuesto una serie de genes como el de la citidina deaminasa activada (*AID*), el gen *LPL* (lipoproteinlipasa A), el *ADAM29*, y el *FRCRL2* que parecen tener valor pronóstico asociado (Montserrat y Moreno, 2008). Gracias a los estudios realizados mediante NGS, se han descrito una nueva serie de lesiones somáticas con implicaciones clínicas. Además de la mutación del gen *TP53* caracterizada con anterioridad, se describen mutaciones en los genes *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, *ATM* y *MYD88*. Estas mutaciones aparecen en un 3-15 % de los pacientes, tanto como única alteración como en combinación con otras (Puente y cols., 2011; Quesada y cols., 2012; Rossi y cols., 2013; Jeromin y cols., 2014; Puiggros y cols., 2014).

### Nuevos índices pronósticos

Hasta el momento se ha estratificado y pronosticado a los pacientes con LLC basándose en los sistemas desarrollados por Rai y Binet (Rai y cols., 1975; Binet y cols., 1981) (ver Tabla 1). Estos índices tienen poca precisión a la hora de discriminar entre grupos y su capacidad de predecir el futuro de pacientes a nivel individual es limitada debido a que únicamente tienen en cuenta parámetros bioquímicos (hemoglobina, recuento plaquetario y linfocitario) y la presencia/ausencia de ganglios linfáticos.

Como consecuencia de la aparición de nuevos marcadores pronósticos, existe la necesidad de establecer nuevos índices pronósticos que permitan tratar a los pacientes de manera individualizada.

En un estudio reciente publicado por Rossi y colaboradores se propone un nuevo modelo integrando datos mutacionales y citogenéticos para el pronóstico de los pacientes con LLC que: (1) permite la segregación de los pacientes en 4 subgrupos con distintas supervivencias, de manera reproducible e independiente de otros factores pronósticos, (2) tiene en cuenta la evolución clonal, y (3) mantiene su relevancia pronóstica independiente en cualquier punto del tiempo desde el diagnóstico. Los 4 grupos son (Rossi y cols., 2013):

- Riesgo alto: portadores mutación *TP53* y/o *BIRC3*. Supervivencia 10 años: 29 %.

## Introducción

- Riesgo intermedio: portadores mutación *NOTCH1* y/o *SF3B1* y/o del11q22-q23. Supervivencia 10 años: 37 %.
- Riesgo bajo: portadores trisomía 12 o cariotipo normal. Supervivencia 10 años: 57 %.
- Riesgo muy bajo: portadores de la del13q14 como única alteración. Supervivencia 10 años: 69,3 %.

De manera muy similar, en 2014 el Grupo Alemán de Estudio de la LLC (*German CLL Study Group: GCLLSG*) publicó un índice pronóstico evaluando 23 marcadores clínicos, biológicos y genéticos (Pflug y cols., 2014). Se basa en la adjudicación de un cociente de riesgo a cada uno de los biomarcadores, y finalmente clasificándolos según se muestra en la tabla 2. El estudio se realizó en una cohorte de 1223 pacientes no tratados y fue validado en una cohorte de pacientes de nuevo diagnóstico de la Clínica Mayo. Actualmente, este índice es de difícil aplicación en la rutina clínica debido a que no todos los laboratorios tienen la posibilidad de analizar los biomarcadores propuestos y además no incluye las nuevas mutaciones con valor pronóstico en la LLC como *NOTCH1*, *SF3B1* y *BIRC3*, ni tampoco las mutaciones de *TP53*.

**Tabla 2.-** Estadios clínicos y sistemas pronóstico en la LLC según el Grupo Alemán de Estudio de la LLC.

Categoría de riesgo	Puntuación	Pacientes (%)	Supervivencia a los 5 años
Bajo	0 a 2	25	95 %
Intermedio	3 a 5	38	82 %
Alto	6 a 10	34	68 %
Muy alto	11 a 14	4	19 %
Parámetro		Puntuación	
Del(17p)		6	
TK >10U/L (en suero)		2	
β-2-microglobulina >3.5 mg/L		2	
β-2-microglobulina de 1,7 a 3,5 mg/L		1	
IGHV no mutada		1	
Escala ECOG >0		1	
Del(11q)		1	
Varón		1	
Edad > 60 años		1	

Escala ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; IGHV: Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina; TK: timidina kinasa

Fuente: (Pflug y cols., 2014; Tam y Seymour, 2014)

En conclusión, los actuales modelos basados en anomalías genéticas deben cambiar a medida que se vayan revelando nuevos hallazgos citogenéticos y nuevas mutaciones, contribuyendo a estudiar la enfermedad a nivel individual. La finalidad de cualquiera de los índices debe ser la identificación de pacientes que requieran tratamientos más agresivos o alternativos (transplante alogénico de células madre) o identificar a aquellos individuos que están en estadios iniciales de la enfermedad y que puedan beneficiarse de una intervención temprana.

### 1.5.- Evolución clonal

La LLC presenta un curso clínico variable parcialmente explicado por las diversas combinaciones de mutaciones somáticas (Landau y cols., 2013). La evolución clonal es un punto clave en la progresión y recaída tumoral. Gracias a la secuenciación completa del genoma (WGS: *whole genome sequencing*) se han detectado cientos de mutaciones somáticas por subclon revelando nuevas mutaciones *driver* tempranas y tardías. Las tempranas aparecen al inicio y son clonales (del(13q) heterocigótica, trisomía 12, mutación *MYD88* y *NOTCH1*) y las tardías aparecen durante el curso de la enfermedad, como eventos secundarios, y son principalmente subclonales (*TP53*, *ATM*, *SF3B1* y del(13q) homocigótica) (Schuh y cols., 2012; Landau y cols., 2013; Puiggros y cols., 2014). Las del(17p) y del(11q) se han descrito tanto como eventos tempranos como tardíos. La aparición de nuevos clones dominantes es más frecuente en LLC en recaída y relativamente infrecuente en pacientes no tratados (Ouillette y cols., 2013).

Los tratamientos con quimioterapia desencadenan la evolución clonal favoreciendo la aparición y dominación de nuevos subclones con mutaciones *driver* (*TP53* o *SF3B1*) que proliferan y sustituyen a otros clones a lo largo del tiempo (Rosenwald y cols., 2004; Schuh y cols., 2012; Landau y cols., 2013).

El estudio de la evolución clonal puede realizarse con FISH (Shanafelt, Hanson, y cols., 2008) y microarrays (Grubor y cols., 2009), en aquellos pacientes con largos periodos de tiempo entre el diagnóstico y el tratamiento, sin embargo, estos métodos comparados con la WGS, sólo detectan un limitado número de alteraciones genéticas (Shanafelt y cols., 2006).

Actualmente se desconoce si la evolución clonal tiene un claro impacto en la supervivencia de los pacientes (Sutton y Rosenquist, 2015). A pesar de ello, es crítico determinar qué clones son biológicamente relevantes para la LLC, y qué genotipos confieren riesgo de progresión o resistencia a tratamiento.

## Introducción

### 2.- La linfocitosis B monoclonal

#### 2.1.- Definición y características clínicas

La linfocitosis B monoclonal (LBM) es una nueva entidad diagnóstica recientemente reconocida por el *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (IWCLL). La LBM se define como la presencia de un número de células B monoclonales circulantes menor a  $5 \times 10^9/L$  en ausencia de linfadenopatías, organomegalias, citopenias o síntomas B (Hallek y cols., 2008). Es una nueva condición preleucémica caracterizada por la continua producción de células con fenotipo LLC en una proporción significativa de individuos adultos sanos (Dighiero, 2008; Landgren y cols., 2009), que a su vez comparte características biológicas con la LLC, incluyendo inmunofenotipo, el uso de genes *IGHV* y estado mutacional y las alteraciones citogenéticas típicas detectadas por FISH (Rossi y cols., 2009; Scarfò y cols., 2010; Henriques y cols., 2013).

Con estos nuevos criterios se deberían reclasificar sobre un 30-40 % de los pacientes diagnosticados de LLC en estadio 0 de Rai pasando a LBM clínicas (Shanafelt y cols., 2008).

Los mecanismos de transformación y evolución de la LBM a LLC permanecen sin esclarecer. Existe controversia respecto el diagnóstico, evolución clínica e indicadores pronósticos (Dighiero, 2008; Hallek y cols., 2008; Rawstron y cols., 2008; Landgren y cols., 2009; Rossi y cols., 2009; Shanafelt y Hanson, 2009; Caporaso y cols., 2010; Scarfò y cols., 2010).

Desde el punto de vista inmunofenotípico, las LBM se clasifican en 3 grupos (Nieto, Teodosio, y cols., 2010; Shanafelt y cols., 2010; Espinet and Puiggros, 2014):

- LBM de fenotipo LLC típico: estos casos presentan las características típicas de LLC, como son la coexpresión de  $CD5^+$  y  $CD19^+$ ,  $CD10^-$ ,  $CD20^{\text{débil}}$ ,  $CD23^+$ ,  $CD79b^{\text{débil}}$  e  $IgS^{\text{débil}}$ . Estas representan un 75 % del total de LBM.

- LBM de fenotipo LLC atípico:  $CD5^+$  con  $CD20^+$  y/o  $CD23^-$ ,  $CD10$ ,  $CD19^+$ ,  $CD79b^{\text{débil}}$ ,  $IgS^+$ , que obligan a descartar el linfoma del manto y constituyen un 10 % de los casos.

- LBM de fenotipo no LLC:  $CD5^-$ ,  $CD10^-$ ,  $CD19^+$ ,  $CD20^+$ ,  $CD23^-$ ,  $FMC7^+$ ,  $CD79b^+$ ,  $IgS^+$ . El inmunofenotipo es consistente con linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmocítico o tricoleucemia, siendo un 15 % del total.

Según el número de linfocitos B clonales, las LBM se clasifican en dos grupos (Dagklis, Fazi, Scarfo, y cols., 2009; Rawstron y cols., 2010; Shanafelt y cols., 2010; Espinet y Puiggros, 2014):

- LBM de recuento bajo (*low count* MBL) o LBM de *screening* poblacional: detectada en la población general, en el marco de estudios epidemiológicos (Almeida y cols., 2011). Se caracteriza por la presencia de una mediana de  $0,001 \times 10^9/L$  linfocitos B clonales. Esta situación tiene un riesgo ínfimo de progresar a una condición leucémica franca.

- LBM de recuento alto (*high count* MBL) o LBM clínica: suele detectarse en el estudio de una linfocitosis. El valor mediano de células B clonales es de  $2,9 \times 10^9/L$ , y un 1-2 % de los casos progresan anualmente a LLC con necesidad de tratamiento (Rawstron y cols., 2008).

### 2.2.- Epidemiología

Actualmente, la prevalencia de la LBM (entre un 0,6 % y un 20 %) se ha visto incrementada tanto por la utilización del hemograma en la rutina clínica como por la introducción de la citometría de flujo para el estudio de los linfocitos presentes en sangre periférica de la población hospitalaria así como en la población general (Nieto y cols., 2009; Shanafelt y cols., 2010). Los bajos porcentajes aparecen en estudios sobre donantes de sangre que suelen ser sujetos jóvenes y sanos (Rachel y cols., 2007). Cabe destacar que la prevalencia aumenta progresivamente con la edad, sobretodo en el grupo de LBM de bajo recuento; aparece en un 5,1 % entre los 40-49 años, en un 5,3 % entre los 50-59 años, un 17,5 % entre los individuos de 60-69 años y pasa a ser del 21,7 % y 27,3 % entre los 70-79 años y 80-89 años respectivamente (Nieto y cols., 2009; Almeida y cols., 2011). Esta asociación ha promovido la hipótesis de que la LBM de recuento bajo podría constituir más un fenómeno fisiológico (inmunosenescencia) que un verdadero estado preleucémico (Nieto y cols., 2010).

Igual que pasa en la LLC, la LBM clínica presenta un predominio en varones, sin embargo en la LBM de recuento bajo es menos evidente (Rawstron y cols., 2002; Nieto y cols., 2009; Shim y cols., 2010).

Ola Landgren y cols han demostrado virtualmente que todos los casos de LLC han sido precedidos por una LBM con fenotipo LLC varios años antes del diagnóstico (Landgren y cols., 2009). La incidencia de LBM es cien veces superior a la LLC, razón por la cual no todos progresan a LLC u otro síndrome linfoproliferativo, únicamente un 1-4 % por año. El 75 % pueden permanecer estables o desaparecer (Dighiero, 2008; Hallek y cols., 2008).

## Introducción

Actualmente, la etiología de la LBM sigue siendo desconocida aunque se sugiere una predisposición genética ya que se ha observado una mayor frecuencia de LBM entre los familiares de primer grado de pacientes con LLC (Rawstron y *cols.*, 2002; Marti y *cols.*, 2003).

Parece ser que existen factores ambientales asociados a una mayor predisposición a padecer LBM de recuento bajo. En la población general adulta, aquellos sujetos que han sido vacunados frente a neumococo o gripe presentan menor prevalencia de LBM de recuento bajo, no se observándose otras características epidemiológicas asociadas a la aparición de LBM (Casabonne y *cols.*, 2012).

El hecho de que todas las LLC estén precedidas (en meses o años) por una fase previa de LBM clínica, hace que estas dos entidades estén estrechamente ligadas (Landgren y *cols.*, 2009). La tasa de progresión de LBM clínica a LLC con necesidad de tratamiento está sobre el 1-2 % y el 5 % de los casos de LLC estadio de Rai 0 que requieren ser tratados (Rawstron y *cols.*, 2008; Shanafelt, Kay, Rabe, y *cols.*, 2009; Scarfò y *cols.*, 2012). Por este motivo se han llevado a cabo diferentes estudios con el fin de establecer diferentes marcadores que ayuden a identificar a los pacientes susceptibles a progresar ya que en la actualidad es el recuento absoluto de células B el único factor de riesgo de progresión de LBM clínica a LLC (Kern y *cols.*, 2012).

Las principales razones para establecer una categoría diagnóstica para aquellos individuos con niveles bajos de células con fenotipo LLC detectables en sangre periférica son; en primer lugar, proporcionar una plataforma para la investigación del pronóstico y riesgo de progresión en el aumentado número de individuos detectados, ya sea en un análisis ordinario o en relación a otra patología. En segundo lugar, nos podría aportar una definición uniforme para facilitar los estudios tanto epidemiológicos como biológicos sobre la condición de padecer LBM.

Aproximadamente un 15 % de LBM clínica evolucionan a LLC en progresión, el 7 % requieren quimioterapia eventualmente y un 2 % fallece como consecuencia de la LLC (Rawstron y *cols.*, 2008). Por lo que es de gran importancia identificar los factores de riesgo (Tabla 3). Tanto los parámetros citogenéticos como el estatus mutacional parecen ser los mejores factores pronósticos a la hora de predecir el riesgo de progresión a LLC (Kern y *cols.*, 2012).

La siguiente tabla resume alguno de los estudios realizados en los últimos años sobre la prevalencia de la LBM, donde se concluye que ni el origen geográfico de los individuos analizados ni la selección de los mismos (atención primaria frente individuos extra hospitalarios) tiene influencia sobre la misma. (Tabla 4).

**Tabla 3.-** Factores asociados a predisposición a LBM y a progresión desde LBM de recuento alto a LLC.

Factores de predisposición a LBM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad</li> <li>• Predisposición genética<sup>a</sup></li> <li>• Factores ambientales: infecciones respiratorias (neumonía) y meningitis</li> </ul>
Factores asociados a progresión desde LBM a LLC
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥ 5.000 linfocitos B con fenotipo LLC/μL de SP</li> </ul>
Factores pronósticos en LLC
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteraciones genéticas del mal pronóstico                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– Deleción 17p13.1<sup>b</sup> (riesgo alto)</li> <li>– Deleción 11q22.3 y deleción 11q23<sup>c</sup> (riesgo intermedio-alto)</li> <li>– Mutaciones del gen <i>NOTCH1</i> (riesgo intermedio-alto)</li> </ul> </li> <li>• Estado mutacional de los genes <i>IGHV</i>: mutado <i>IGHV</i> (riesgo bajo) vs no mutado <i>IGHV</i> (riesgo alto)</li> <li>• Marcadores fenotípicos: CD38<sup>high</sup> (riesgo alto); ZAP-70<sup>+</sup> (riesgo alto); CD49d<sup>+</sup> (riesgo alto)</li> </ul>

<sup>a</sup> >10 % de individuos sanos familiares de pacientes con LLC presentan LBM (Rawstron y cols., 2002)

<sup>b</sup> Anomalía citogenética que afecta al gen supresor de tumores *TP53*.

<sup>c</sup> Anomalías citogenéticas que afectan a los genes *ATM* y *MLL*, respectivamente.

Fuente: (Almeida y cols., 2014)

**Tabla 4.-** Tabla resumen sobre la prevalencia de la LBM en los últimos años.

Grupo de pacientes			Prevalencia LBM tipo LLC	
Referencia	Edad media y rango	n	% todas las edades	% >60 años
Población residencial U.S. (Shim y cols., 2007)	53 (40-78)	1926	0.6	>0.6*
Donantes de sangre US (Rachel y cols., 2007)	45 (18-79)	5141	0.14	0.9
Sanidad primaria Reino Unido (Rawstron y cols., 2008)	57 (40-90)	910	3.5	5.0
Atención primaria Italia (Ghia y cols., 2004)	74 (65-98)	500	5.5	5.5 <sup>a</sup>
Sanidad primaria Reino Unido (Rawstron y cols., 2008)	74 (60-80)	1520	5.1	5.1 <sup>b</sup>
Población residencial Italia (Dagklis y cols., 2009)	55 (18-102)	1725	7.4	8.9
Atención primaria España (Nieto y cols., 2009)	62 (40-97)	608	12.0	>20*

\* Estimación de los datos

<sup>a</sup> Edad sobre 65 años

<sup>b</sup> Rango de edad 60-80 años

## Introducción

### 2.3.- Alteraciones genéticas y moleculares en la LBM

La tabla 5 muestra un resumen de los trabajos publicados hasta la fecha sobre la presencia de anomalías cromosómicas en la LBM.

Debido a las diferencias genéticas y moleculares entre las LBM de recuento bajo y las de recuento alto o clínicas es imprescindible estudiarlas por separado (Espinet y Puiggros, 2014):

#### ✓ **Alteraciones en LBM de recuento bajo**

A pesar de que comparten el mismo fenotipo que las LBM tipo LLC de recuento alto o clínica y las LLC de estadio Rai 0, las LBM tipo LLC de recuento bajo parecen ser una entidad claramente distinta. Los estudios que se han llevado a cabo sobre el repertorio de genes de la cadena pesada de inmunoglobulinas (*IGHV*) demuestran que existen diferencias entre la LBM de recuento bajo y la LLC. El uso de genes de *IGHV* en la LLC (diríjase al apartado 1.1) es muy restringido y sesgado, en comparación al repertorio de genes *IGHV* utilizados en linfocitos B de un adulto sano y son raramente usados en la LBM de recuento bajo, independientemente de su estado mutacional. Sin embargo, los genes expresados por la LBM de recuento bajo coinciden con los expresados por individuos de edad avanzada (*IGHV4-59/61*) apoyando la idea de que la LBM de recuento bajo estaría más ligada a un proceso de inmunosenescencia que con la leucemogénesis (Dagklis, Fazi, Scarfo, y cols., 2009; Vardi y cols., 2013). Otra diferencia con la LLC es el hecho de que las LBM de recuento bajo expresen raramente los BCR estereotipados, presentes en más de un 30 % de las LLC. (Stamatopoulos y cols., 2007; Agathangelidis y cols., 2012). Respecto a la presencia de hipermutaciones somáticas del gen *IGHV*, que en la LLC se asocian a pronóstico favorable, éstas se han descrito en aproximadamente el 75 % de los casos de LBM de recuento bajo, de LBM clínicas y de LLC estadio de Rai 0, frente al 55 % de los casos de LLC en general (Vardi y cols., 2013).

Respecto a las alteraciones citogenéticas presentes en este grupo, de manera sorprendente se han hallado las mismas que las descritas en los casos de LLC (del(13q), trisomía 12, del(11q) y del(17p)). La del(13q) es la alteración más frecuente en este grupo de pacientes, describiéndose en una proporción similar a la presente en los casos de LLC (Rawstron y cols., 2008; Fazi y cols., 2011). Entre las alteraciones asociadas a mal pronóstico, la del(17p) ha sido descrita en 1-2 % de los pacientes, sin signos de progresión en la mayoría de pacientes (Fazi y cols., 2011; Lanasa y cols., 2011). La presencia de alteraciones comunes sugiere que éstas ocurren en una fase muy temprana del desarrollo de la célula B.



Como hemos mencionado anteriormente, gracias a estudios de secuenciación masiva en LLC, se han descrito una serie de mutaciones en los genes *NOTCH1*, *MYD88*, *SF3B1* y *BIRC3* (Puente y cols., 2011) y que se han asociado claramente a resistencia en los tratamientos y progresión. Actualmente, ninguno de estos genes se ha descrito en la LBM de recuento bajo.

Los datos inmunogenéticos de esta entidad sugieren que esta condición no es clínicamente relevante y su monitorización y análisis sólo parece ser importante con fines de investigación (Vardi y cols., 2013).

**Tabla 5.-** Alteraciones cromosómicas en la linfocitosis B monoclonal (LBM) con fenotipo LLC.

	Del(13q) %	Trisomía 12 %	Del(11q) %	Del(17p) %
<b>(Rawstron y cols., 2008)</b> LBM recuento normal	39 (15/38)	18 (4/22)	0 (0/21)	0 (0/10)
<b>(Rawstron y cols., 2008)</b> LBM clínica	58 (19/33)	21 (7/33)	6 (2/33)	3 (1/33)
<b>(Shanafelt y cols., 2009)</b> LBM clínica	44 (56/126)	18 (23/126)	2 (2/126)	2 (4/126)
<b>(Nieto y cols., 2009)</b> Atención primaria	27 (10/37)	5 (2/37)	0 (0/37)	0 (0/37)
<b>(Fazi y cols., 2011)</b> LBM con fenotipo LLC	43,8 (7/16)	28 (4/16)	0 (0/16)	12,5 (2/16)
<b>(Lanasa y cols., 2011)</b> LBM con fenotipo LLC	73 (22/30)	7 (2/30)	0 (0/30)	3 (1/30)

✓ **Alteraciones en LBM de recuento alto o LBM clínicas**

Los estudios inmunogenéticos y el análisis del repertorio de *IGHV* muestran que tanto el repertorio de inmunoglobulinas como la frecuencia de estereotipia son muy similares en las LBM clínicas y la LLC estadio Rai 0. El subtipo de receptores estereotipados más frecuente en LBM clínicas (*IGHV3-21/IGHJ6 VH CDR3*) coincide con el subtipo que en la LLC parece presentar un comportamiento clínico agresivo (Vardi y cols., 2013).

Respecto a las alteraciones cromosómicas, los pacientes con LBM clínica presentan las mismas que se han descrito en la LLC, incluso los porcentajes de del(13q) y trisomía 12 son similares a los descritos (Rossi y cols., 2009; Shanafelt, Kay, Rabe, y cols., 2009; Scarfò y cols., 2012; Morabito y cols., 2013). Sin embargo, tanto las

## Introducción

deleciones en 17p y 11q como las mutaciones en el gen *TP53* aparecen en menor proporción respecto a la LLC, pero de igual forma que ocurre en la LLC éstas pueden adquirirse con el tiempo debido a la evolución clonal (Rossi y cols., 2009).

Los estudios recientes de secuenciación masiva han sacado a la luz una serie de genes en la LLC que también se ven mutados en la LBM clínica pero con unos porcentajes claramente inferiores a los descritos en la LLC (Puente y cols., 2012; Quesada y cols., 2012; Rasi y cols., 2012; Rossi y cols., 2012; Greco y Capello, 2013; Morabito y cols., 2013; Lionetti y cols., 2014).

A pesar de que existen genes con mutaciones penetrantes de la línea germinal que pueden ser determinantes para una proporción de casos de LLC familiar, no se ha identificado un gen responsable. Existen estudios de alelos de baja penetrancia que predisponen a los individuos a LLC o influye en su curso clínico (Slager y cols., 2007; Di Bernardo y cols., 2008; Enjuanes y cols., 2008). Especialmente variaciones polimórficas de los genes *FARP2*, *IRFL* y *SP140* que se han implicado recientemente en la etiología de riesgo de la LBM (Crowther-Swanepoel y cols., 2010).

## 3.- ESTRÉS OXIDATIVO

El término “*estrés oxidativo*” fue propuesto por H. Sies y E. Cadenas en la década de los 80, y se emplea para describir los efectos deletéreos de los radicales libres (RL) sobre los sistemas biológicos (Sies, 1986).

Las células aerobias dependen del oxígeno para sobrevivir, sin embargo, muchos de los productos que se originan durante la respiración celular son por naturaleza potentes oxidantes para otras moléculas. Por consiguiente, las células aerobias tienen que pagar un precio inevitable que es la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno (ROS) de las que se han de defender (Fridovich, 1978). Esta situación se conoce como la “paradoja del oxígeno”.

Como radical libre (RL) se conoce la configuración paramagnética que adoptan algunas moléculas que presentan uno o más electrones desapareados. Este hecho le aporta una alta e indiscriminada reactividad que le permite a su vez intercambiar electrones con un número variado de moléculas orgánicas a las que modifica oxidativamente haciéndoles perder su función biológica (Sáez y cols., 1995).

El estatus oxidativo de un individuo es el resultado del equilibrio entre la producción y eliminación de las especies reactivas del oxígeno. Cuando analizamos el estatus oxidativo podemos encontrarnos delante de diversas situaciones. Una situación de

equilibrio ocurrirá siempre y cuando la formación de radicales libres (en cantidad normal o incrementada) sea neutralizada por los sistemas antioxidantes del propio individuo. Cuando esto no ocurre se presenta el desequilibrio. Como consecuencia se produce un daño oxidativo en el organismo. Este daño o estrés oxidativo puede deberse a un aumento de la agresión por parte de los radicales libres y aunque los sistemas antioxidantes funcionen correctamente no son capaces de neutralizarlos. Cuando los sistemas antioxidantes disminuyen y no son capaces de contrarrestar a los radicales libres que se forman en concentraciones fisiológicas también se origina un daño oxidativo.

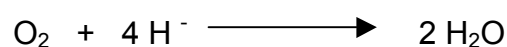
### 3.1.- Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

Los radicales libres pueden originarse a partir de diversas moléculas entre las cuales destacaremos el átomo de hidrógeno (H<sup>·</sup>), el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), los metales de transición como el hierro y el cobre, las moléculas de oxígeno nitrogenadas y los fosfolípidos de membrana. También pueden originarse a partir de cualquier molécula que sea capaz de convertirse en radical libre al aceptar energía o sufrir la rotura de enlaces.

Con frecuencia se emplea de forma errónea el término “radical libre del oxígeno” porque incluye a todas las especies reactivas del oxígeno intermedias, incluidas aquellas formas que no son radicales. Por este motivo, el término “especies reactivas del oxígeno” (ROS) es más adecuado.

El término “especies reactivas del oxígeno” se emplea para designar de modo colectivo tanto a los radicales de oxígeno (radical superóxido, hidroxilo,...) como a las especies no radicales (peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y ácido hipocloroso) que se comportan como oxidantes. Las especies reactivas del oxígeno son las formas moleculares o atómicas del oxígeno que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, ya sea por la fijación de un electrón suplementario, por la transferencia de un electrón desde una órbita interna o por la pérdida de un electrón de la órbita externa.

En condiciones fisiológicas las células metabolizan la mayor parte del oxígeno hasta convertirlo en agua sin la formación de intermediarios parcialmente reducidos y altamente reactivos, mediante la vía de reducción tetravalente:



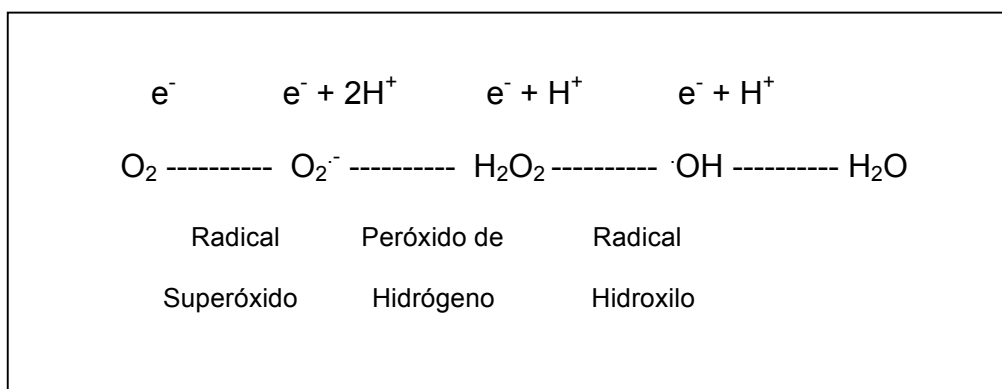
Esta reacción se lleva a cabo gracias a la enzima citocromo oxidasa-a-3 que pertenece al último eslabón de la cadena respiratoria celular donde participan cuatro centros redox.

## Introducción

Entre el 1 y el 5 % del oxígeno no se metaboliza de la manera anteriormente citada sino que se reduce parcialmente, es decir, de forma incompleta dando lugar a intermediarios o especies reactivas del oxígeno incompletamente reducidas: el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que no es un radical pero puede generarlos y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Figura 1).

Los procesos metabólicos donde estas especies moleculares se generan son numerosos, destacando por la cantidad de sus productos la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

**Figura 1.-** Reducción monovalente del oxígeno molecular.



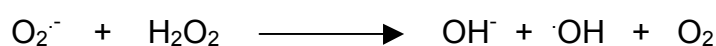
- **Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**

El radical superóxido es una molécula de oxígeno a la cual se le ha fijado un electrón externo suplementario. Este radical no se considera como una especie particularmente reactiva, pero es capaz de atravesar los lípidos de membrana a través de canales aniónicos y producir otros radicales libres mucho más reactivos como el radical hidroxilo (Freeman y Crapo, 1982). Actúa principalmente como agente reductor mediante la donación de su electrón extra, aunque también puede actuar como oxidante reduciéndose hasta peróxido de hidrógeno.

Entre las reacciones que originan la formación de otros radicales a partir del radical superóxido, destacan la reacción de Haber-Weiss y la reacción de Fenton que se describen a continuación.

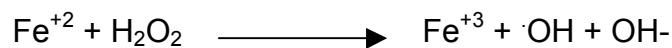
En la reacción de Haber-Weiss reaccionan el radical superóxido con el peróxido de hidrógeno, originando un radical hidroxilo y un ión hidroxilo.

### Reacción de Haber-Weiss

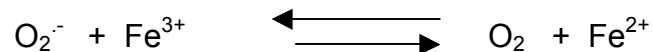


Por otro lado, el peróxido de hidrógeno reacciona con iones ferrosos en la reacción de Fenton que tiene como productos el radical hidroxilo y un ión férrico. En los sistemas biológicos la disponibilidad de iones ferrosos es limitante, por lo tanto, es necesario un reciclaje del hierro por parte de un agente reductor como el radical superóxido (óxido reducción cíclica del hierro).

#### Reacción de Fenton



#### Óxido-reducción ciclíca del hierro



- **El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva pero no es un radical como ya se mencionó anteriormente. La mayor parte del peróxido de hidrógeno se forma gracias a la dismutación del O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Es un oxidante y reductor débil, por ello es relativamente estable. Es poco reactivo en ausencia de iones metálicos, aunque en su presencia puede llegar a ser muy tóxico para las células debido a la formación de radicales hidroxilo que se generan en la reacción de Fenton y Haber-Weiss (Gutteridge y Wilkins, 1983).

Cuando el peróxido de hidrógeno actúa como sustrato de la enzima mieloperoxidasa, se forma ácido hipocloroso que es también un producto altamente oxidante.

- **El radical hidroxilo (·OH)**

Este radical es considerado en la actualidad, como el mayor responsable de los efectos citotóxicos de las ROS, presentando mayor reactividad que el radical superóxido. Presenta gran afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados, los hidratos de carbono, las proteínas y las bases nucleotídicas del ADN donde induce mutaciones. El organismo no tiene sistemas detoxificantes para este radical provocando un alto grado de daño oxidativo.

### **3.2.- Fuentes biológicas de especies reactivas del oxígeno**

Las especies reactivas del oxígeno pueden provenir tanto de fuentes endógenas, debidos al metabolismo oxidativo, como de fuentes exógenas.

## Introducción

### ▪ Fuentes endógenas

Las especies reactivas del oxígeno se generan a nivel endógeno en los procesos biológicos intra y extracelulares, tanto fisiológicos como patológicos, en prácticamente todos los tejidos. Pueden producirse en cantidades superiores a lo normal y las defensas antioxidantes no ser capaces de neutralizarlos.

Entre las fuentes endógenas destacan:

#### - Cadena de transporte de electrones

La mayor parte del oxígeno consumido es metabolizado en la mitocondria mediante la vía de reducción tetravalente (Antonini y cols., 1970). Sin embargo existe una fracción mínima de oxígeno que escapa y sufre una reducción monovalente formando metabolitos reactivos del oxígeno parcialmente reducidos y altamente tóxicos (McCord, 1983).

Tanto las membranas del retículo endoplasmático como de la membrana nuclear contienen citocromos P<sub>450</sub> y b<sub>5</sub> que por autooxidación pueden generar especies reactivas del oxígeno. A su vez, la membrana citoplasmática es constantemente atravesada por radicales libres y es el lugar donde frecuentemente inician sus reacciones. Existe una gran cantidad de NADPHoxidasa presente en las membranas citoplasmáticas de los fagocitos y es una fuente importante de ROS.

El peroxisoma es un orgánulo celular donde la alta producción de radicales libres se ve favorecida por el aumento de concentración de las oxidasas (Keller y cols., 1991).

#### - Productos o intermediarios del metabolismo oxidativo

Otro posible origen endógeno de ROS son los productos o intermediarios del metabolismo oxidativo, a través de la acción catalítica de una serie de enzimas productoras de radicales superóxido y de peróxido de hidrógeno como son la xantina oxidasa, la galactosa oxidasa, la indolamina oxigenasa, etc...

#### - Mecanismo de acción de las células fagocíticas

Debido al efecto biocida de las especies reactivas del oxígeno, las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) las han incorporado a ciertos mecanismos defensivos para la destrucción de bacterias o agentes extraños. Estas ROS serán producidas durante la actividad fagocítica, y en los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Además, son esenciales para la defensa contra la invasión microbiana (Babior, 1978).

#### - Reacciones de autooxidación

Son reacciones de oxidación espontáneas de grupos funcionales como tioles, proteínas, flavinas reducidas, o quinonas reducidas, que darán lugar a radicales, oxigénicos o no, de alta reactividad por ser paramagnéticos.

▪ **Fuentes exógenas**

Existen diversos factores exógenos que incrementan la producción de especies reactivas del oxígeno. Entre ellos destacar la biotransformación de drogas e inducción de ciclos redox, las radiaciones ionizantes o de alta energía, la radiación solar (luz visible con fotosensibilización), los componentes del humo de tabaco y otros contaminantes ambientales, el shock térmico, el oxígeno hiperbárico y el ejercicio físico extenuante entre otros.

**3.3.- Mecanismos de defensa antioxidante**

Un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, bien por interacción y estabilización de especies reactivas, o bien por transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida (Halliwell y Gutteridge, 1990; Gutteridge, 1995).

En condiciones fisiológicas, la concentración de antioxidantes es varios órdenes de magnitud superior a la concentración de especies reactivas pero aún así, existe una formación constante pero controlada de ROS. Cuando existe este equilibrio podemos hablar de una correcta “fisiología oxidativa”, descubriendo así los efectos fisiológicos de las ROS. Es en estas concentraciones controladas cuando ejercen efectos reguladores (Salvador y cols., 2006) (Figura 2).

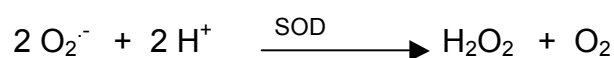
Generalmente, los antioxidantes se clasifican en: enzimáticos, no enzimáticos y coadyudantes o secundarios.

○ **Antioxidantes enzimáticos**

Este grupo está formado por moléculas de estructura compleja y elevado peso molecular, como son las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR).

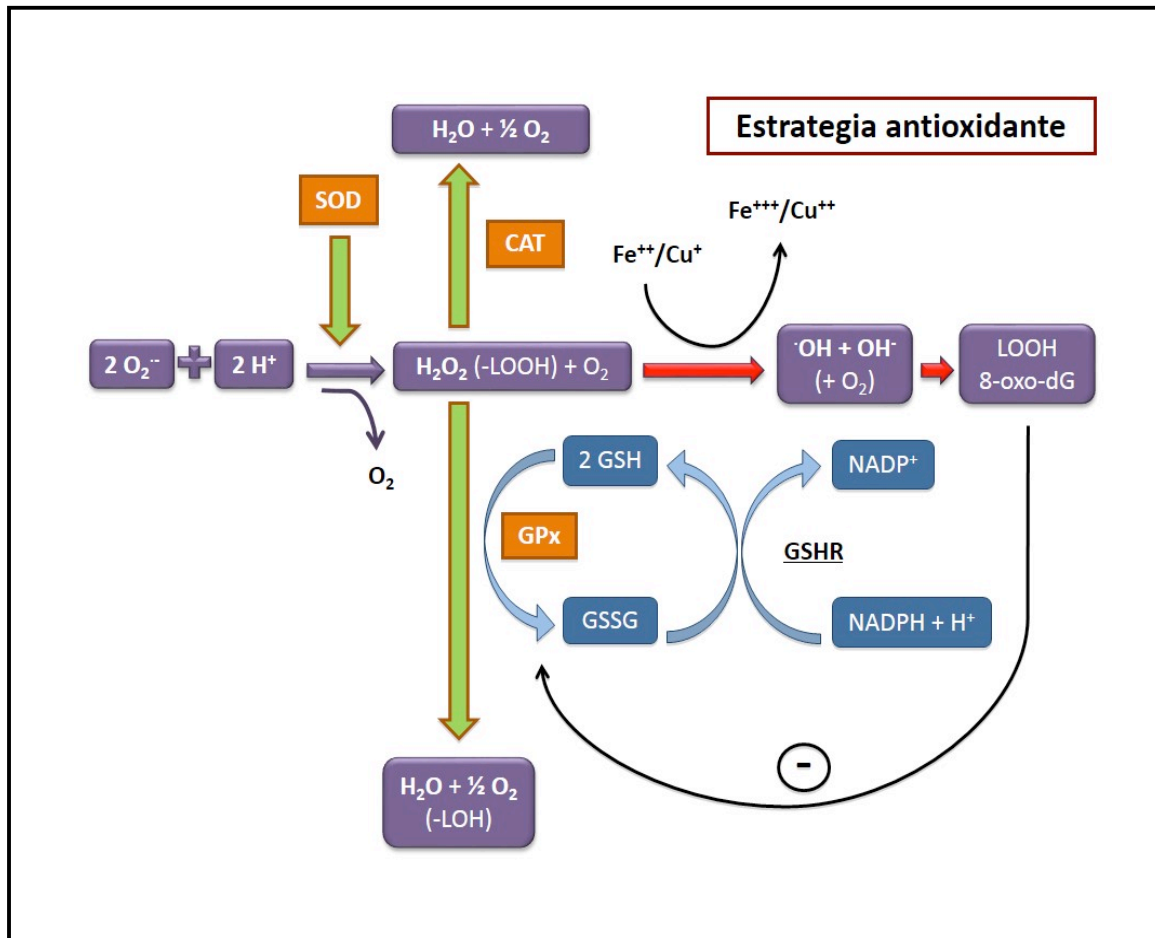
- Superóxido dismutasa (SOD)

Fue descrita por McCord y Fridovich en 1969 y es la responsable de oxidar una molécula de superóxido hasta oxígeno molecular y reducir otra molécula de superóxido a peróxido de hidrógeno (McCord y Fridovich, 1969).



## Introducción

Figura 2. Estrategia enzimática antioxidante.



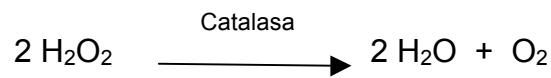
La familia de las superóxido dismutasas está formada por diversas metaloformas. La Cu,Zn-SOD (Pm= 30 kDa, dimérica, cromosoma 21) se localiza principalmente en el citosol aunque también se ha encontrado en el espacio intermembrana de la mitocondria, en el núcleo, los lisosomas y los peroxisomas. Su distribución tisular se centra en tejidos con actividades metabólicas altas como hígado y riñón. La Mn-SOD (Pm= 80 kDa, tetramérica, cromosoma 6) generalmente actúa a nivel de la matriz mitocondrial aunque puede encontrarse en el citosol donde tiene lugar su biosíntesis, para ser posteriormente transportada a la mitocondria. Se distribuye en tejidos con tasas respiratorias elevadas como el miocardio. Y finalmente, la EC-SOD (extracelular) con un Pm= 135 kDa, formada por 4 subunidades unidas no covalentemente.

La regulación de la producción de SOD se debe tanto a la cantidad de oxígeno tisular, como a la producción de radicales superóxido intracelulares.



### - Catalasa (CAT)

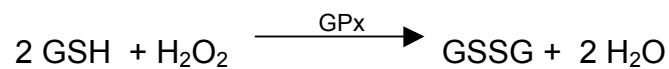
Esta enzima cataliza la dismutación y peroxidación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.



Las catalasas están ampliamente distribuidas por los tejidos, localizándose fundamentalmente en peroxisomas, aunque también se han detectado en mitocondrias cardíacas. Las catalasas son hemoenzimas formadas por cuatro cadenas proteicas en las que el átomo de hierro realiza el intercambio redox. Su peso molecular es de 240 kDa, y el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 11. Esta enzima tiene una vida media corta como la SOD y tiene la actividad catalítica más rápida que se conoce.

### - Glutation Peroxidasa (GPx)

Es en la década de los 50 cuando Mills descubre la actividad de esta enzima, la cual cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua; y la de los hidroperóxidos lipídicos a alcoholes estables y agua, mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG).



Existen dos variantes de GPx. La GPx dependiente de selenio es una proteína tetramérica de 80 kDa, con 4 átomos de selenio, elemento esencial para su actividad y que a su vez controla la síntesis de la proteína. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 3. Esta enzima tiene como función eliminar los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) e inorgánicos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Por otro lado, la GPx no selenio dependiente tiene un peso molecular inferior a la selenio dependiente, una estructura dimérica y únicamente es capaz de eliminar los hidroperóxidos orgánicos (ROOH).

Las GPx están presentes en citosol y matriz mitocondrial (Ketterer, 1986). La expresión de estas enzimas se induce mediante estrés oxidativo. Algunas patologías las expresan de manera aberrante como los enfermos de hepatitis y varios tipos de cáncer (Townsend y cols., 2003).

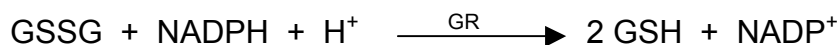
### - Glutación reductasa (GR)

Esta enzima es una de las claves de la defensa antioxidante. Es la responsable de regenerar el glutatión reducido (GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG).

## Introducción

La cantidad de GSH en la célula es limitada y la elevación del cociente GSSG/GSH es altamente tóxico para la misma, por lo que esta enzima es esencial para el funcionamiento de las GPx que se encargan de la eliminación del peróxido de hidrógeno consumiendo GSH.

La GR lleva unido a la enzima FAD (Flavín adenín dinucleótido) que actúa como coenzima:



La GR necesita NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) para llevar a cabo la reducción del glutatión. La NADPH, que se genera en la vía de las pentosas, actúa como transportador de hidrógeno y de electrones, por su capacidad para sufrir oxidación y reducción de manera reversible. Tiene un papel esencial en el metabolismo para las reacciones de transferencia de energía y constituye una segunda línea de defensa antioxidante.

### ○ **Antioxidantes no enzimáticos**

Este grupo de antioxidantes lo constituyen moléculas de bajo peso molecular y menor tamaño que las anteriores. Pueden tener tanto carácter hidrofílico como lipofílico protegiendo de esta forma todos los compartimentos celulares.

#### - Glutatión (GSH y GSSG)

El glutatión es un tiol tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina; y su actividad antioxidante se debe al grupo tiol de la cisteína. Según el estado de reducción de la molécula podemos hablar de la forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG).

El glutatión en su forma reducida, GSH, es probablemente el antioxidante celular no enzimático más importante, sobretodo a nivel mitocondrial. En su ausencia, no sería posible la acción de la GPx, acumulándose el peróxido de hidrógeno y causando un daño mitocondrial extenso. El GSH es capaz de reaccionar independientemente de la GPx con especies reactivas como el radical superóxido e hidroxilo.

El GSH adquiere sus propiedades reactivas gracias al grupo tiol de la Cys como se ha mencionado anteriormente. En la siguiente tabla se exponen las principales funciones fisiológicas del GSH (Tabla 6) (Viña, J.R., Sáez, G.T. and Viña, 1989).

El glutatión también puede actuar como un oxidante donando un átomo de hidrógeno de los grupos SH. Se formarán radicales GS en lugar de GSH, los cuales serán capaces de reaccionar con el oxígeno generando radicales oxisulfuro potencialmente dañinos.

El glutatión oxidado (GSSG), está formado por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro. Es muy tóxico para las células, por lo cual la relación GSSG/GSH debe mantenerse muy baja mediante la reducción del GSSG a GSH gracias a la acción de la glutatión reductasa, como se mencionó en el apartado 3.1, o bien exportándolo al exterior de la célula. Esta relación se considera un marcador fiable del grado de estrés oxidativo celular (Viña, J., Viña, 1986; Oliva y cols., 1997; Oztürk and Gümüslü, 2004).

### - Ácido ascórbico o Vitamina C

Este antioxidante se ha considerado históricamente como uno de los más poderosos y quizá menos tóxico de los antioxidantes naturales.

El ácido ascórbico es hidrosoluble y de bajo peso molecular. Se encuentra distribuido tanto en medio intracelular como extracelular. Sus propiedades antioxidantes fueron descritas por primera vez en 1928 por el investigador Szent-Györdyi (Szent-Györgyi, 1928).

**Tabla 6.-** Funciones fisiológicas del glutatión reducido.

***Funciones protectoras:***

- Detoxificación de xenobióticos
- Papel frente al estrés oxidativo
- Prevención de la formación de cataratas
- Protección frente los efectos de las radiaciones

***Funciones metabólicas:***

- Síntesis del ADN
- Regulación de la síntesis de proteínas
- Regulación de la proteólisis
- Reservorio de cisteína
- Ahorro de metionina
- Regulación de la gluconeogénesis
- Regulación de la vía de las pentosas fosfato
- Desiodinación de la hormona tiroidea
- Coenzima
- Homeostasis del calcio
- Síntesis de leucotrienos
- Mantenimiento del estatus tiólico en la membrana celular
- Formación de enlaces disulfuro en las proteínas
- Modificación de la estructura de la hemoglobina

***Papel del glutatión en los procesos de transporte:***

- Secreción de hormonas polipeptídicas
- Función de la insulina
- Función de la hormona paratiroidea
- Liberación de neurotransmisores
- Papel en el ciclo g-glutamilo en la captación de aminoácidos

El ácido ascórbico actúa como antioxidante reduciendo radicales libres como el  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ , oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y ácido hipocloroso. Los seres humanos somos

## Introducción

incapaces de sintetizar esta vitamina, por lo tanto, la debemos incorporar a través de la dieta, especialmente de los frutos cítricos donde la concentración de vitamina C es muy elevada.

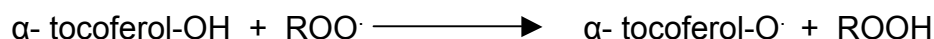
Cuando se encuentra en presencia de metales de transición, gracias a su capacidad para formar  $Fe^{+2}$ , actúa paradójicamente como un potente inductor de la formación de radicales libres.

Estudios recientes concluyen que el consumo adicional de ascorbato a través de suplementos antioxidantes, podría no ser tan beneficioso como se creía (Bjelakovic y cols., 2007).

### - $\alpha$ - tocoferol o Vitamina E

El  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante liposoluble más efectivo; defiende y mantiene la integridad de los fosfolípidos de membrana. Se encuentra en bajas concentraciones en los tejidos (Schüep y Rettenmaier, 1994).

La vitamina E reacciona con los radicales peroxilo y alcoxilo formados durante la peroxidación lipídica, originando así un hidroperóxido (que se degradará mediante la vía de la GPx) y un radical tocoferol, el cual tiene suficiente estabilidad y poca reactividad.



El radical tocoferol puede reaccionar con el ácido ascórbico o con GSH para reconvertirse en  $\alpha$ - tocoferol.

### - Carotenoides

Los carotenoides, junto con la vitamina E, son los principales antioxidantes de las membranas biológicas. Esta propiedad antioxidante se debe a su sistema de dobles enlaces conjugados.

Actualmente se conocen unos 600 carotenoides, entre los más importantes se encuentran el  $\alpha$  y  $\beta$  caroteno, la luteína, los licopenos, la zeaxantina y la criptoxantina.

La función principal de los carotenoides es la eliminación de los radicales peroxilos y el oxígeno singlete.

Se han realizado diversos estudios donde parecen tener una capacidad antimutagénica y anticarcinogénica (Krinsky, 1993).

### - Melatonina

La melatonina es una hormona de origen pineal y posee acciones protectoras y antioxidantes (Reiter, 1995).

### - Otros sistemas antioxidantes

Existen más sustancias con capacidad antioxidante que se pueden sintetizar en el propio organismo o que pueden ser incorporadas a través de la dieta. Entre ellas, citar el ácido úrico, la bilirrubina, la transferrina, la ferritina, los quelantes de iones metálicos, las proteínas como la ceruloplasmina, los polifenoles, los flavonoides, las aminas aromáticas, la haptoglobina, el ácido lipoico y la ubiquinona.

También existen antioxidantes sintéticos como la N-acetilcisteína, la penicilamina, los aminosalicilatos, los lazaroides y el tamoxifeno entre otros.

#### o **Antioxidantes coadyudantes o secundarios**

El papel principal de este grupo de antioxidantes es servir de apoyo a los sistemas antioxidantes anteriormente citados.

Esta acción antioxidante secundaria la realizan mediante la aportación de sustratos a los sistemas enzimáticos, bien mediante los sistemas de transporte o reparando las estructuras que hayan podido verse afectadas por los radicales libres como el ADN o las proteínas.

Algunos antioxidantes secundarios son la quinona óxido reductasa (diaforasa), la glucosa-6-P-deshidrogenasa, los sistemas de conjugación y/o transporte y los sistemas de reparación de ADN.

### **3.4.- El daño oxidativo**

Las especies reactivas del oxígeno se originan de forma rápida, son moléculas con una vida media corta, y a su vez muy reactivas.

Estas características hacen que únicamente puedan dañar de forma directa a las moléculas que tienen a su alrededor. Sin embargo, existe un daño indirecto provocado por especies reactivas secundarias a ellas y a la degradación de productos formados durante el ataque oxidativo que amplifican el daño y las moléculas que pueden verse afectadas.

Los mecanismos de acción para producir oxidación sobre los lípidos, proteínas, glúcidos y ADN se detallan a continuación (Figura 3).

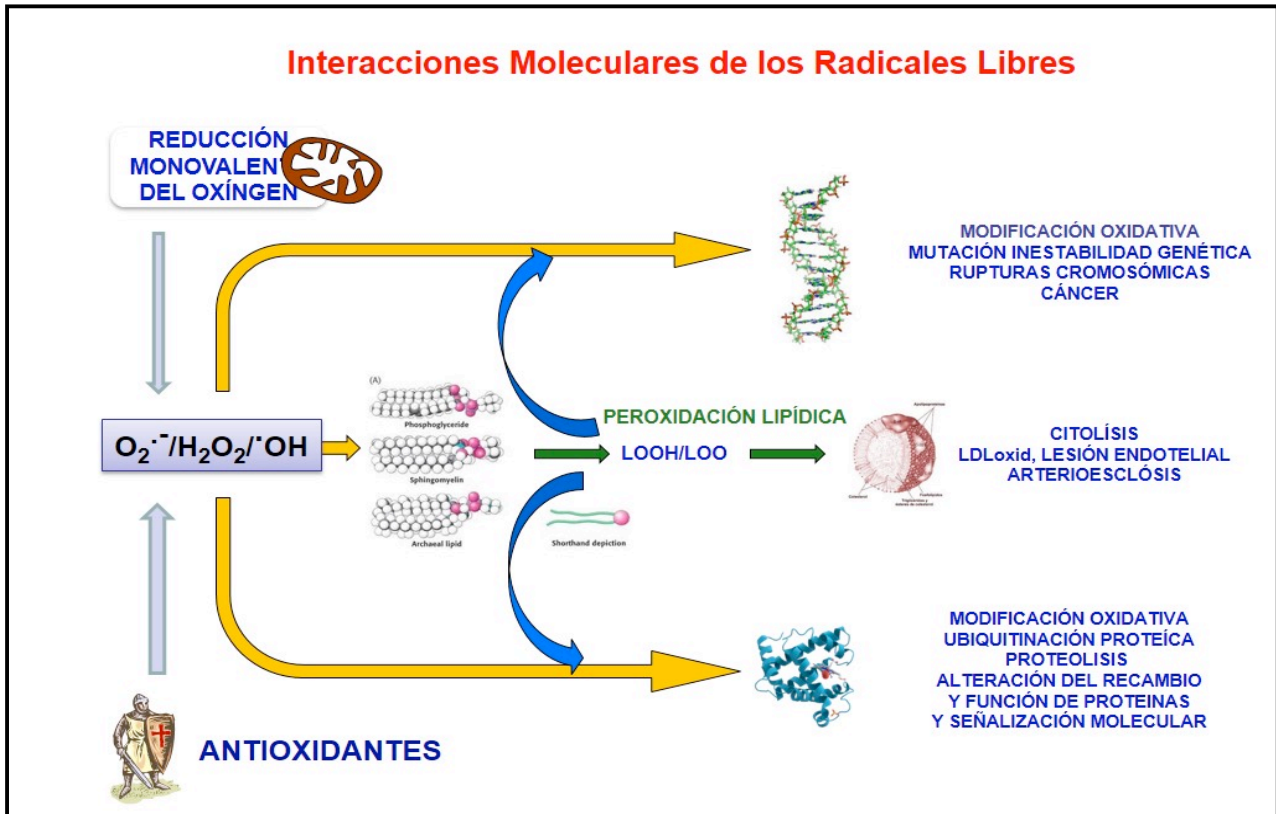
#### - **Daño oxidativo a los lípidos**

Cuando los radicales libres han superado las barreras antioxidantes quedan libres para oxidar a una gran variedad de moléculas como por ejemplo los lípidos. El proceso por el cual los radicales libres o especies reactivas del oxígeno eliminan un átomo de

## Introducción

hidrógeno de las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados se conoce como “peroxidación lipídica” o “lipoperoxidación”.

**Figura 3.-** Interacción de los radicales libres con biomoléculas celulares.



Este ataque, ocurre sobretodo, a nivel de los dobles enlaces de las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos que forman parte de las membranas biológicas, aunque también puede ocurrir a nivel del enlace éster entre el glicerol y el ácido graso.

La peroxidación lipídica consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

### - Iniciación

Consiste en la extracción de un átomo de hidrógeno de un carbono contiguo a un doble enlace por parte de una especie oxidativa como el radical hidroxilo, y la consiguiente formación de un radical lipídico alquil.

La capacidad del radical hidroxilo (generado mediante la reacción de Fenton) de iniciar la peroxidación es incuestionable, aunque es necesario mencionar su escasa movilidad.

La presencia de otros metales como el plomo o aluminio también podrían ser responsables del inicio de la peroxidación (Aruoma y cols., 1989).

### - Propagación

En esta etapa una serie de reacciones en cadena contribuyen a aumentar el número de sustancias citotóxicas.

Los radicales lipídicos alquil formados durante la iniciación reaccionarán con el oxígeno molecular y por consiguiente, se formarán radicales lipídicos peroxil. El efecto de propagación se debe a la capacidad que tienen estos radicales lipídicos formados para eliminar un nuevo átomo de hidrógeno, liberando un nuevo radical libre que podrá continuar su efecto oxidante.

Una vez formado el radical lipídico peroxil, éste puede a su vez reaccionar con endoperóxidos (precursores del malondialdehído, MDA) que darán como producto final de la peroxidación al MDA. Otro producto que es generado en cantidades importantes durante la fase de propagación es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Tanto el MDA como el HNE tienen propiedades mutagénicas (Valko y *cols.*, 2006).

Es la etapa de propagación la que explica el daño en cadena de la peroxidación lipídica.

### - Terminación

Las reacciones de lipoperoxidación acaban cuando los carbonos o radicales peróxidos se entrecruzan y forman productos conjugados que ya no son radicales. En este momento, los ácidos grasos también pueden ser fragmentados generando un gran número de productos, entre ellos el MDA y HNE, anteriormente mencionados. Durante esta fase de terminación también puede intervenir algún tipo de antioxidante de carácter eliminador, conocidos como *scavengers* (captadores fisiológicos de radicales libres).

El ataque de los radicales libres sobre los fosfolípidos de los tejidos tiene como consecuencia la formación de los F<sub>2</sub>-isoprostanos (F<sub>2</sub>-IsoPs). Estas moléculas descritas por primera vez en 1990 se originan a partir del ácido araquidónico y su formación es independiente de la ciclooxigenasa (Morrow y *cols.*, 1990; Milne y *cols.*, 2007).

Los F<sub>2</sub>-IsoPs son moléculas estables detectables en todos los tejidos humanos y fluidos biológicos analizados, incluidos el plasma, la orina, fluido del lavado broncoalveolar, fluido cerebroespinal y bilis (Morrow y *cols.*, 1999). Niveles altos de F<sub>2</sub>-IsoPs se han descrito en diversas enfermedades como la aterosclerosis, hipercolesterolemia, diabetes, obesidad, fumadores, enfermedades neurodegenerativas y artritis reumatoide entre otras.

## **Introducción**

### **- Daño oxidativo a las proteínas**

Parece ser que las proteínas son menos susceptibles a ser oxidadas por parte de los radicales libres. En condiciones fisiológicas, donde no existe un desequilibrio oxidativo, las proteínas dañadas son reparadas sin provocar daño celular.

Cuando las proteínas van unidas a un metal (metaloproteína) pueden ser atacadas por los radicales libres con mayor facilidad. Algunos ejemplos de metaloproteínas fácilmente oxidables por los ROS son la mioglobina, la catalasa y la Cu,Zn-SOD.

Existen aminoácidos más susceptibles a padecer daño oxidativo que otros, como la prolina, la histidina, la arginina y la cisteína entre los más atacados.

El daño proteico se produce en el residuo de aminoácido unido a un grupo hidroxilo. Esta oxidación puede tener varios efectos como la ruptura de cadenas, alteración de la expresión génica, mutación y cáncer como última consecuencia.

Los cambios estructurales pueden ser a su vez, causados por errores durante la síntesis proteica originados por los RL. Como ya es conocido, el daño estructural de una proteína puede hacer que ésta pierda su función afectando finalmente al metabolismo celular.

### **- Daño oxidativo a los glúcidos**

Los carbohidratos también son diana de los radicales libres pero en menor proporción que las moléculas anteriormente citadas.

Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir especies reactivas (Sies., 1986; Blake y cols., 1987). La enzima superóxido dismutasa protege a los polisacáridos frente a la despolimerización causada por las ROS (Fridovich, 1976).

### **- Daño oxidativo al ADN**

Los procesos endógenos capaces de producir un daño significativo del ADN son: la oxidación, la metilación, la desaminación y la despurinización. De todos ellos parece ser la oxidación quien juega un papel más importante (Ames, 1989).

La oxidación del ADN causa modificaciones que originan mutaciones puntuales, deleción de fragmentos polinucleotídicos, incluso rotura de una o ambas cadenas de ADN y/o trastornos estructurales, incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida parcial o total de determinados cromosomas.

Los radicales hidroxilo son los principales responsables de la oxidación del ADN, causando daño tanto sobre las bases nucleotídicas (púricas y pirimidínicas), como sobre



las desoxirribosas. Aunque el radical hidroxilo es poco difundible debido a su alta reactividad, el peróxido de hidrógeno sirve como una forma difundible y latente del hidroxilo, el cual reacciona con un ión metálico cerca de la molécula de ADN provocando su oxidación (Marnett, 2000).

Entre todas las bases nucleotídicas que forman el ADN la guanina parece ser la más susceptible a la oxidación (Nakabeppu y *cols.*, 2004). La lesión oxidativa mejor estudiada durante mucho tiempo ha sido la 8-hidroxi(oxo) guanina (8-oxo-G), índice del daño en el ADN mitocondrial, pero en la actualidad se emplea con mayor frecuencia, la detección de la base modificada oxidativamente 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) (Valko y *cols.*, 2006).

La oxidación de la guanina a 8-oxo-dG induce errores en la replicación del ADN por parte de la polimerasa ADN dependiente, y permite el establecimiento de puentes de hidrógeno con adeninas y timinas en lugar de con citosinas. Esta base 8-oxo-dG es la lesión oxidativa más frecuente encontrada en el ADN bajo condiciones fisiológicas y es uno de los parámetros más representativos del estrés oxidativo *in vivo* como ya hemos comentado. La ADN polimerasa incorpora selectivamente citosinas y adeninas opuestas a una 8-oxo-dG de acuerdo con las propiedades de complementariedad de ésta.

Una vez se ha producido la incorporación errónea de la base oxidada en lugar de la guanina, su estabilidad le permite escapar al reconocimiento de los mecanismos de lectura y reparación originando una mutación estable. El resultado de este cambio será una transversión G-C a A-T, y posiblemente sea la más frecuente en términos oxidativos (Oliva y *cols.*, 1999) (Figura 4).

El resto de bases también pueden ser modificadas oxidativamente y los productos más frecuentes son la Timina glicol (5,6-dihidroxitimina) (TG), la Timidina glicol (5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimidina) (dTG), el 5-hidroximetil uracilo (HMU), la 5-hidroxi-2'-desoxiuridina (HMdU), la 8-hidroxi(oxo)guanina (8-oxo-G) y la 8-hidroxi(oxo)-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG). Su potencial mutagénico se conoce menos al existir un menor número de estudios relacionados (Oliva y *cols.*, 1999).

La acción de agentes físicos (radiaciones ionizantes y de alta energía) y/o químicos (xenobióticos) son causantes de muchas alteraciones en las moléculas del ADN.

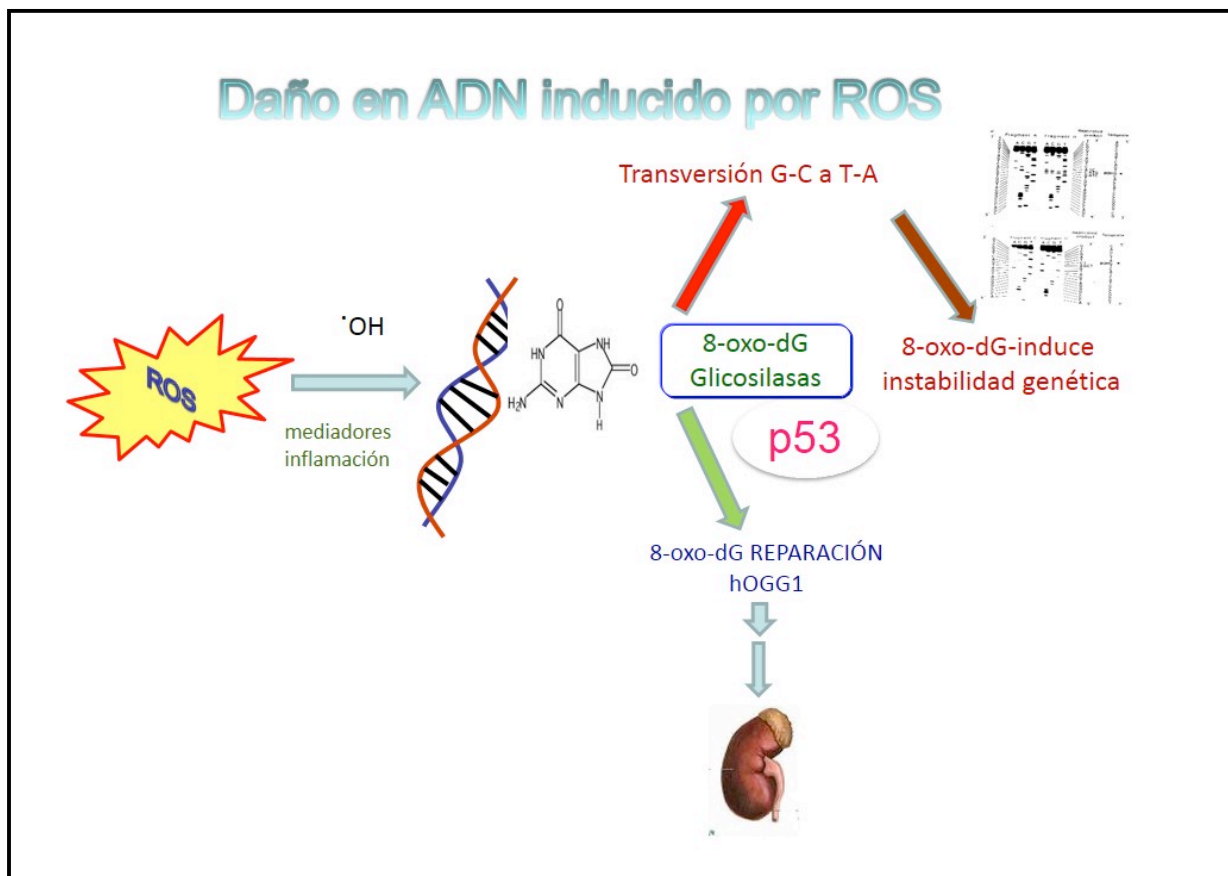
El ADN juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad celular por lo que su protección frente al daño oxidativo es imprescindible. Esta protección se realiza gracias a sistemas enzimáticos que previenen el ataque oxidativo y reparan los daños presentes.

## Introducción

La batería de enzimas reparadoras consta de:

- *Endonucleasas* y *exonucleasas* que se encargan de corregir y eliminar la incorporación de bases erróneas.
- *Glicosilasas* y *polimerasas* que tienen como misión rellenar con la base complementaria adecuada los espacios resultantes de lesiones, o los generados por las nucleasas anteriormente citadas.
- *Ligasas* encargadas de unir los fragmentos antiguos con los nuevos fragmentos de ADN generados por las polimerasas.

**Figura 4.-** Daño del ADN inducido por ROS.



El ADN presente en la mitocondrias, orgánulo por excelencia productor de especies reactivas oxigénicas, recibe impactos con una frecuencia 10 veces superior que el ADN nuclear, debido a su desprotección. El ADN mitocondrial no posee moléculas de naturaleza básica como las histonas, ni presentan una estructura compacta que lo proteja del daño oxidativo ni presenta sistemas de reparación (Oliva y cols., 1999).

Errores en la transcripción podrían ocasionar graves consecuencias en el crecimiento celular. Para evitar esos posibles errores los mecanismos de transcripción y

reparación actúan acoplados y así evitan que los posibles errores en el ARN mensajero se expresen. En ocasiones, los niveles de expresión de los genes codificantes para las enzimas reparadoras de ADN se ven disminuidos por la acción de los radicales libres (Valko y cols., 2006). Los subproductos de las reparaciones celulares se excretan por el sistema excretor urinario, y una mayor excreción es indicador de mayor daño oxidativo.

### 3.5.- Biomarcadores de estrés oxidativo

Actualmente se han identificado más de 40 índices que nos calculan el estado oxidativo. El estatus oxidativo de un individuo debería definirse bajo el análisis de múltiples biomarcadores (Abuja y Albertini, 2001; Dotan y cols., 2004) ya que es la suma de las moléculas generadas por el ataque de los radicales libres, la susceptibilidad de los componentes a ser oxidados y la capacidad del organismo de defenderse de la oxidación.

Dotan y cols publicaron en 2004 una revisión sobre la metodología disponible para la evaluación del daño oxidativo que se resume a continuación:

#### 1. Métodos basados en la composición:

Estos índices se basan en la cuantificación de la concentración de diversos componentes relevantes, como los promotores o inhibidores de la peroxidación y los productos de la misma.

- Promotores: son propiamente los radicales libres y se pueden cuantificar mediante resonancia de espín electrónico o mediante sustancias como el luminol.
- Inhibidores o antioxidantes:
  - Bajo peso molecular: GSH, Vitamina E, Vitamina C, ácido úrico,...
  - Alto peso molecular: SOD, CAT, GPx, GR,...
- Productos de la peroxidación: estos índices se basan en la cuantificación de los productos de peroxidación lipídica (dienos, MDA, F<sub>2</sub>-isoprostanos), peroxidación proteica (proteínas carboniladas) y daño del ADN (8-oxo-dG).

2. Cuantificación de la susceptibilidad oxidativa: se cuantifica la hemólisis eritrocitaria

3. Cuantificación de la capacidad antioxidante de los líquidos biológicos: en la mayoría de estudios se valora la capacidad de determinados fluidos biológicos de inhibir la oxidación y su capacidad de actuar como reductores.

### 3.6.- Implicaciones clínicas del estrés oxidativo

Las consecuencias negativas que tiene el estrés oxidativo sobre el organismo despiertan un gran interés. El daño oxidativo se ha relacionado con diversos procesos

## Introducción

fisiológicos como el embarazo y envejecimiento, y con procesos patológicos, siendo el cáncer el más importante de ellos, al cual se le dedica un apartado a continuación.

En la siguiente tabla 7 se expone una relación de enfermedades y situaciones patológicas en las que los radicales libres han intervenido en su fisiopatología (Dalle-Donne y cols., 2003; Montuschi y cols., 2004).

**Tabla 7.-** Enfermedades y situaciones fisiopatológicas en las cuales se ha determinado la existencia de estrés oxidativo con biomarcadores de peroxidación.

---

<b>Enfermedades Cardiovasculares</b>	
- Arteriosclerosis	
- Isquemia- reperfusión	
- Patología de la arteria coronaria	
- Fallo cardíaco	
- Género masculino	
	- Hiperhomocisteinemia
	- Enfermedad renovascular
	- Hipercolesterolemia
<b>Enfermedades neurológicas</b>	
- Alzheimer	
- Huntington	
- Esclerosis múltiple	
- Enfermedad de Creutzfeld-Jacob	
	- Esclerosis lateral amiotrófica
	- Demencia con cuerpos de Lewy
	- Parkinson
<b>Enfermedades pulmonares</b>	
- Asma	
- EPOC	
- Fibrosis quística	
- Daño pulmonar agudo	
	- Enfermedad intersticial pulmonar
	- Displasia broncopulmonar
	- Fumar
<b>Enfermedades renales</b>	
- Hemodiálisis	
- Daño renal inducido por rabdomiólisis	
	- Insuficiencia renal crónica
	- Uremia crónica
<b>Enfermedades hepáticas</b>	
- Daño hepático por alcoholismo crónico	
- Síndrome hepatorenal	
	- Trasplante hepático
	- Cirrosis urinaria biliar
<b>Otras enfermedades</b>	
- Esclerodermia	
- Sepsia severa	
- Varicela	
- Síndrome de Down	
- Enfermedad de Crohn	
- Osteoporosis	
	- Caracterogénesis
	- Amiloidosis sistémica
	- Artritis reumatoide y crónica juvenil
	- Preclampsia
	- Psoriasis
	- Diabetes

---

### 3.7.- Estrés oxidativo y cáncer

La carcinogénesis es el proceso por el cual células normales se transforman en células cancerosas. Este proceso es complejo, una célula sana pasa en primer lugar a un estadio precancerígeno y finalmente, pasa a un estadio inicial del proceso carcinogénico.

Se han propuesto dos mecanismos que podrían explicar la inducción cancerígena de las células. En el primero, un agente carcinógeno no genotóxico podría ocasionar el aumento de la síntesis de ADN y la capacidad mitótica de las células, que a su vez han incorporado mutaciones debido a una carencia en los mecanismos de reparación de

ADN. El segundo mecanismo, se basa en el desequilibrio antes descrito entre la proliferación y muerte celular. En el momento en el que una célula ha sufrido daño en su material genético, ésta entra en un estado de apoptosis o muerte celular programada. La proliferación descontrolada se presenta cuando los sistemas inductores de la apoptosis son ineficaces, por ejemplo en mutaciones del gen *TP53*. Este gen se encuentra mutado en el 50 % de los cánceres humanos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Se ha demostrado de forma clara y evidente el papel de los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno como mediadores en el mecanismo de la transformación maligna celular. Estas especies reactivas actúan en los distintos estadios del proceso cancerígeno, como iniciadores, promotores y responsables también de la expansión tumoral. Están relacionados con la expresión de proto-oncogenes y en la inhibición o activación de genes supresores de tumores como *TP53*.

El modelo establecido para el proceso carcinogénico se basa en múltiples y distintos estadios que se describen a continuación (Oliva y cols., 1999; Valko y cols., 2006; Ziech y cols., 2011):

La fase de **iniciación** implica la aparición de una mutación en el ADN que conlleva a la alteración de la célula. Esta mutación se fijará durante la replicación. Si las células en división sufren cualquier tipo de daño éstas son capaces de interrumpir temporalmente el ciclo celular, reparar el daño, y reanudar posteriormente su división. Esta fase del proceso es reversible.

La **promoción** de la carcinogénesis se caracteriza por una expansión clonal de las células iniciadas, como consecuencia de una inducción de la proliferación celular acompañada de una inhibición de la apoptosis. Ésto conlleva a la aparición de una lesión focal. Para que la promoción tumoral no se detenga es necesaria la presencia de un estímulo tumoral mantenido en el tiempo, si éste desaparece, el daño será reversible. Muchos de estos promotores tumorales inhiben los sistemas antioxidantes celulares (Loft and Poulsen, 1996; Tudek y cols., 2010).

En la fase de **progresión**, una serie de cambios moleculares y celulares favorecen el paso de las células desde un estado preneoplásico a neoplásico de forma irreversible. El daño del ADN se acumula provocando inestabilidad genética y un trastorno de la integridad cromosómica.

Los factores ambientales como el humo del tabaco, la exposición a radiaciones ionizantes y la propia dieta del individuo contribuyen al desarrollo tumoral con un aumento de la oxidación en el ADN. El estrés oxidativo actúa como mecanismo patogénico (Ames y cols., 1985; Oliva y cols., 1997).

## Introducción

Las especies reactivas del oxígeno tienen un papel dual en la promoción del cáncer. Éstas juegan un papel anti-cancerígeno, inducen a las células dañadas a entrar en un estado de senescencia, apoptosis, necrosis y otros tipos de muerte celular, e inhibiendo procesos como la angiogénesis. A su vez, también están implicadas en procesos pro-cancerígenos, incrementando la proliferación e invasión celular, la angiogénesis, la metástasis e inhibiendo la apoptosis (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los estudios desvelan que un aumento de ROS tiene como consecuencia directa un incremento en la aparición de cáncer.

El mecanismo de oxidación del ADN parece ser el evento esencial para la transformación maligna celular inducida por los radicales libres (Oliva y cols., 1999). La producción excesiva de radicales libres, en condiciones de estrés oxidativo, puede lesionar de forma irreversible moléculas como el ADN y otras estructuras moleculares como fosfolípidos, y producir la muerte celular. Los subproductos de peroxidación de lípidos como el MDA y estructuras relacionadas, contribuyen al proceso de propagación del proceso oxidativo a estructuras membranosas vecinas, y sus subproductos resultan igualmente nocivos, siendo la mayor parte mutagénicos y cancerígenos (Niedernhofer y cols., 2003).

El mayor o menor grado en la oxidación de ADN varía de un tejido a otro y posiblemente esté relacionado con la intensidad de las alteraciones de los sistemas antioxidantes de estos tejidos.

A su vez, el aumento de la presencia de bases oxidadas pueden contribuir a la inestabilidad genética de las células tumorales y de esta forma aumentar su potencial metastásico.

Los radicales libres ocasionan diversas alteraciones en la molécula de ADN como son: mutaciones, deleciones, roturas de dobles cadenas, generación de lesiones cromosómicas, formación de núcleos microcíticos, daño a proteínas histónicas y la distorsión de señales de traducción; todos ellos implicados en la aparición, desarrollo y expansión tumoral.

Se ha observado que los radicales oxigénicos son causantes de mutaciones puntuales en regiones de alta incidencia (“*hot spots*”) localizadas en los codones 11, 12 y 61 del oncogen *C-HAS-RAS-1* junto con los codones 248 y 249 del gen supresor de tumores *TP53* (Oliva y cols., 1999).

La relación entre el factor nuclear p53 y las especies reactivas es compleja. Esta proteína consta de 10 residuos de cisteína, algunos de los cuales son esenciales para la unión de la proteína con secuencias específicas de ADN. La acción de este gen supresor

de tumores se activa bajo radiaciones UV y  $\gamma$ , hipoxia celular, y también cuando existe una carencia de nucleótidos. Las diferentes funciones que desempeña esta proteína están íntimamente ligadas con el cáncer y con las especies reactivas.

Cuando no existe daño oxidativo y la proteína p53 está intacta, ésta promueve la expresión de genes codificantes para proteínas antioxidantes, y puede intervenir en la reparación del ADN (Bensaad and Vousden, 2005; Sablina y cols., 2005). En el caso que los niveles de estrés oxidativo aumenten, la expresión del gen *TP53* se incrementa y promueve la expresión de genes prooxidantes. Las células que hayan sufrido daño, entrarán en fase de senescencia o muerte celular. Si *TP53* pierde su función, como consecuencia o no de un aumento de los niveles intracelulares de ROS, es incapaz de desempeñar su función pro-apoptótica en las células dañadas. Como consecuencia, el daño aumentará y las mutaciones se acumularán iniciándose la tumorigénesis.

Las especies reactivas del oxígeno también pueden estar relacionadas con la acción de otras proteínas que intervienen en el ciclo celular, por ejemplo ATM. La función de esta proteína está relacionada con la reparación del ADN, con el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y con los puntos de control del ciclo celular (Takao y cols., 2000; Shiloh and Ziv, 2013). A su vez, esta proteína puede implicarse de forma directa o indirecta con el estado redox del organismo, ya que está relacionada con la expresión de genes con acción antioxidante.

La proteína ATM se une a los puntos de rotura del ADN, y gracias a su actividad quinasa, que se incrementa con la unión, fosforilará a una serie de sustratos que o bien se encargarán de reparar el daño o bien de inducir la apoptosis (Barzilai y cols., 2002). Se ha descrito que una deficiencia de ATM confiere una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, en comparación con células con la proteína normal (Barzilai y Yamamoto, 2004)

Los defectos genéticos que afectan a genes implicados en la respuesta celular al daño del ADN, tienen como consecuencia directa un aumento de la inestabilidad genómica. Provocan una mayor sensibilidad celular al daño del ADN y predisponen al proceso carcinogénico (Barzilai y cols., 2002).

Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en el aumento de la capacidad invasiva y metastásica de las células cancerígenas. Promueven el aumento de la interleucina 8 (IL-8) que tiene características pro-angiogénicas y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Kundu y cols., 1995). La angiogénesis consiste en la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, y es fundamental en la transformación maligna del crecimiento celular (Carmeliet y Jain, 2000). La proteína

## Introducción

p53 regula este proceso activando genes que inhiben la neurovascularización y reprimiendo a aquellos relacionados con el crecimiento de los vasos sanguíneos.

Parece ser que las células tumorales también producen ROS, explicando tal vez así, la resistencia de algunos tumores a la citólisis oxidativa. Esta producción endógena podría mantener la inestabilidad cromosómica de estas células y colaborar en su capacidad invasiva y nociva sobre los tejidos cercanos (Szatrowski y Nathan, 1991).

### 3.8.- Metabolismo oxidativo en la LLC y en la LBM

La LLC es una hemopatía maligna con un curso clínico muy heterogéneo. Una parte de los pacientes padecen la enfermedad de una forma indolente. En cambio, existe una porción de los enfermos que progresan al poco tiempo de haber sido diagnosticados y requieren de tratamiento.

Existe una estrecha relación entre la leucemia y el estrés oxidativo. Las células leucémicas producen mayor cantidad de ROS que las células normales (Szatrowski y Nathan, 1991).

En la actualidad, existen numerosos estudios sobre el papel del estrés oxidativo en diferentes hemopatías como síndromes mielodisplásicos, leucemias agudas de origen mieloide y linfoide, mieloma múltiple, y linfomas entre otros. En la siguiente tabla se muestra un resumen de la bibliografía dedicada a este tema (Tabla 8).

Un aumento de la excreción de bases modificadas oxidativamente en la orina, y de la cantidad presente en el ADN es típico de la mayoría de tejidos neoplásicos (Sentürker y cols., 1997). Este incremento puede ser debido tanto a un descenso de la capacidad de reparación de lesiones del ADN, como a un aumento de la susceptibilidad del material genético a ser dañado, o a la unión de ambas situaciones (Tuck y cols., 1999, 2000). Diversos grupos han descrito un aumento del daño oxidativo en el ADN de pacientes con SMD (Honda y cols., 2000; Jankowska y cols., 2008); y leucemia aguda (Sentürker y cols., 1997). El aumento de la base oxidada 8-oxo-dG en LLC fue descrito por primera vez, por nuestro grupo en 2001 (Oltra y cols., 2001).

Otra de las macromoléculas que puede sufrir daño debido a la acción de las especies reactivas del oxígeno son los fosfolípidos de membrana. La peroxidación lipídica genera una serie de subproductos como el MDA que a su vez actúan ampliando el daño a las moléculas contiguas. El aumento de estos subproductos también puede deberse al fallo de los sistemas antioxidantes (Szatrowski y Nathan, 1991). El incremento en los subproductos derivados de la peroxidación lipídica ha sido descrito tanto en LLC (Oltra y cols., 2001; Bakan y cols., 2003) como en leucemias agudas (Battisti y cols., 2008). En



cambio, otros grupos describen niveles de peroxidación lipídica similares entre los pacientes de leucemia y los individuos control (Devi y cols., 2000; Er y cols., 2007).

**Tabla 8.-** Referencias bibliográficas sobre el papel del estrés oxidativo en diferentes hemopatías.

Patología	Referencia bibliográfica	Patología	Referencia bibliográfica
LLC	Hopkins y Tudhope, 1973 Farber y cols., 1989 Silber y cols., 1992 Oltra y cols., 2001 Moran y cols., 2002 Bakan y cols., 2003 Zhou y Hileman, 2003 Djurdjovic y cols., 2009 Zelen y Djurdjevic, 2010 Jitschin y cols., 2014 De Rosa y cols., 2015	LLA y LMA	Nishiura y cols., 1992 Sentürker y cols., 1997 Misaki y cols., 2003 Kennedy y Santella, 2004 Zhou y cols., 2007 Er y cols., 2007 Battisti y cols., 2008 Caron y Krull, 2009 Zhou y cols., 2010 Rasool y cols., 2015
LNH	Shacter y cols., 2000 Wang y cols., 2006 Lightfoot y cols., 2006	MM	Kuku y cols., 2005 Isham y cols., 2007 Lodh y cols., 2012
LMC	Ahmad y cols., 2008 Ahmad y cols., 2010 Petrola y cols., 2012 Pande y cols., 2015	SMD	Fracchiolla y cols., 2003 Farquhar y Bowen, 2003 Novotna y cols., 2009 Kikuchi y cols., 2012
Varios tipos de cáncer hematológico	Honda y cols., 2000 Devi y cols., 2000 Paul y De, 2010 Udensi y Tchounwou, 2014 Abdul-Aziz y cols., 2015		

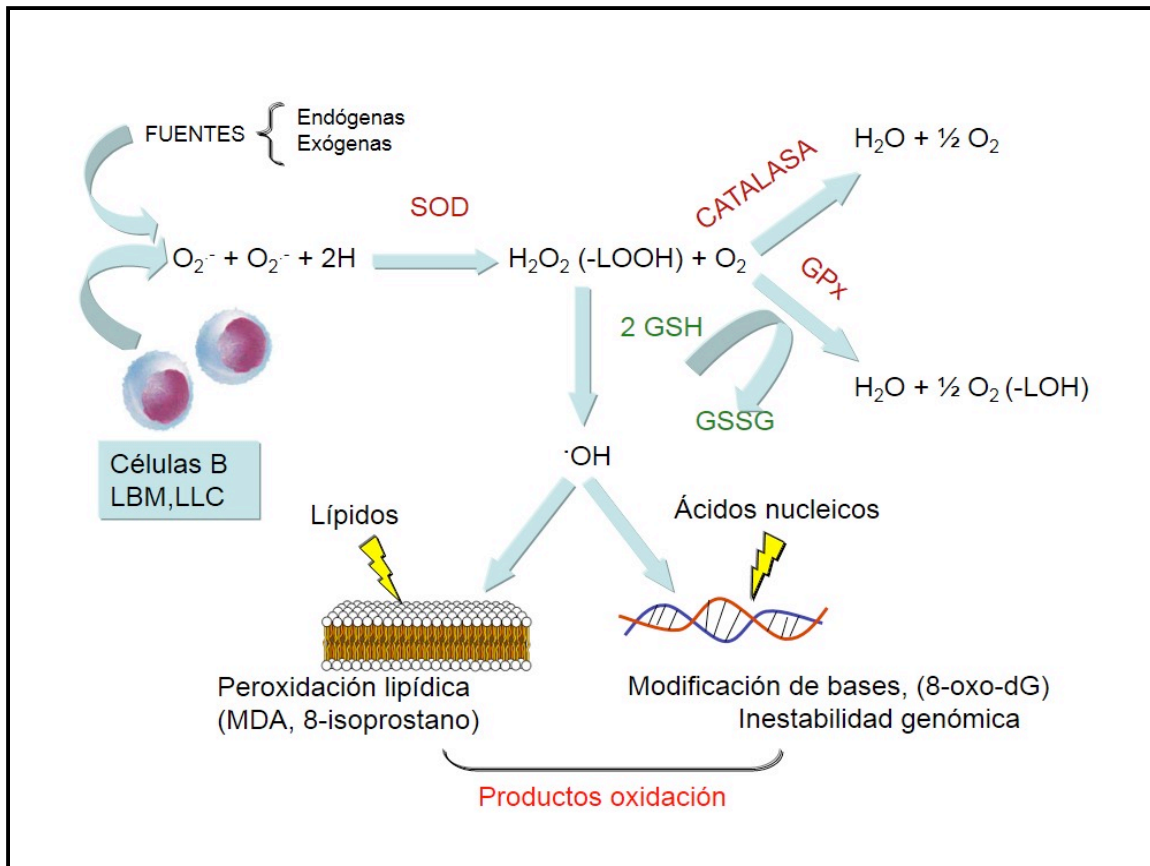
SMD: síndrome mielodisplásico; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mieloblástica aguda; MM: mieloma múltiple; LNH: linfoma no hodgkin; LMC: leucemia mieloide crónica; LLC: leucemia linfática crónica; LBM: linfocitosis B monoclonal.

Los niveles de glutatión, tanto en su forma reducida (GSH) como oxidada (GSSG), han sido objeto de estudio en la LLC. El glutatión es un tiol imprescindible para la integridad celular debido a las funciones de bio-reducción y detoxificación celular que desempeña. Los resultados descritos sobre los niveles de GSH en los pacientes con LLC son dispares. Unos grupos describen un incremento de GSH (Ferraris y cols., 1994; Paydas y cols., 1995; Oltra y cols., 2001), y sin embargo otros, publican valores inferiores en los pacientes de LLC respecto a los sujetos control (Silber y cols., 1992).

## Introducción

Los sistemas enzimáticos antioxidantes también se ven alterados en los pacientes de diversos tipos de neoplasias de origen hematológico (Hopkins y Tudhope, 1973; Farber y cols., 1989; Nishiura y cols., 1992; Sentürker y cols., 1997; Devi y cols., 2000; Oltra y cols., 2001; Bakan y cols., 2003; Er y cols., 2007; Battisti y cols., 2008) (Figura 5).

**Figura 5.-** La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y enzimas antioxidantes implicadas en la patogénesis de la LBM y la LLC.



# **Hipótesis y objetivos**



La **leucemia linfática crónica** (LLC) es la leucemia más común en los países occidentales y se caracteriza por un curso clínico muy variable donde una parte de los pacientes no requieren tratamiento durante largos periodos de tiempo, mientras otra parte de ellos progresan rápidamente y como consecuencia de la enfermedad fallecen. Esta heterogeneidad clínica podría explicarse en parte por la gran diversidad genética de los linfocitos B.

Por otro lado, la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) provoca un estado de desequilibrio redox, más conocido como **estrés oxidativo**, el cual contribuye a la inestabilidad genómica. Estudios previos han demostrado una disfunción en el sistema de defensa antioxidante y un aumento en el daño sobre la base de ADN 8-oxo-2'-deoxyguanosina (8-oxo-dG) en la LLC. Sin embargo, actualmente se conoce poco la relación entre la presencia del daño oxidativo y la adquisición de alteraciones cromosómicas específicas.

La **linfocitosis B monoclonal** (LBM) es una nueva condición preleucémica caracterizada por la continua producción de células con fenotipo LLC en una proporción significativa en individuos adultos sanos (Dighiero, 2008; Landgren y *cols.*, 2009), que a su vez comparte características biológicas con la LLC, incluyendo inmunofenotipo, el uso de genes *IGHV* y estado mutacional y las alteraciones citogenéticas típicas detectadas por FISH.

Se estima que el 40% de las LLC en estadio 0 de Rai deberían ser reclasificadas como LBM. Esto nos hace pensar que ambas patologías pudiesen compartir un estatus oxidativo alterado, ya que los estudios realizados hasta la fecha en la LLC incluían pacientes que posteriormente se han reclasificado.

Nuestra **hipótesis de trabajo** se basa en averiguar si existe estrés oxidativo en la fase preleucémica (linfocitosis B monoclonal) y observar si su perfil oxidativo tiene mayor parecido a los sujetos control o a los pacientes con LLC. A su vez creemos interesante analizar la posible relación entre las alteraciones citogenéticas y el estrés oxidativo de los pacientes.

Los **objetivos** que pretende abordar el presente trabajo son los siguientes:

1. Analizar el *estatus* oxidativo de pacientes afectos de linfocitosis B monoclonal y leucemia linfática crónica, comparándolo con una población de sujetos control sanos.

## **Hipótesis y Objetivos**

2. Establecer los niveles de defensa antioxidante entre los pacientes con LBM, LLC, y la población control.
3. Relacionar el daño oxidativo con la posible adquisición de determinadas alteraciones cromosómicas.
4. Correlacionar los parámetros oxidativos estudiados con las principales características clínico-biológicas de los pacientes.
5. Valorar si el daño oxidativo de los pacientes con LLC, presenta modificaciones durante la evolución natural de la enfermedad.

# **Material y métodos**





### III.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.- Pacientes estudiados

Se estudiaron un total de 29 pacientes con LBM y 55 pacientes con LLC-B diagnosticados en el servicio de Hematología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia entre los años 2005 y 2007. Se incluyeron además un grupo de 31 individuos sanos con una mediana de edad de 66 años (rango 40-99 años) de los cuales 21 fueron varones (54 %) y 18 mujeres (46 %). Ningún paciente había recibido tratamiento previo.

El diagnóstico se realizó según los criterios morfológicos e inmunofenotípicos propuestos por el IWCLL (Hallek y cols., 2008). La LBM se definió como la presencia de un número de células B monoclonales circulantes menor a  $5 \times 10^9/L$  en ausencia de linfadenopatías, organomegalia, citopenias o síntomas B (Hallek y cols., 2008).

Para cada paciente incluido en el estudio se recopilaron los siguientes datos clínico-biológicos:

1. Edad.
2. Sexo.
3. Número de leucocitos en sangre periférica ( $\times 10^9/l$ ).
4. Número de linfocitos en sangre periférica ( $\times 10^9/l$ ).
5. Número de neutrófilos en sangre periférica ( $\times 10^9/l$ ).
6. Niveles de hemoglobina (g/dl).
7. Número de plaquetas ( $\times 10^9/l$ ).
8. Niveles de  $\beta$ -2- microglobulina (mg/l).
9. Niveles de lactatodeshidrogenasa (LDH)(U/l)
10. Estadio clínico (Rai y cols., 1975 y Binet y cols., 1989)
11. Morfología de los linfocitos B, analizada a partir de extensiones teñidas con May-Grünwald-Giemsa.
12. Datos inmunofenotípicos: CD38 y ZAP-70.

#### 2.- Recogida y procesamiento de las muestras

##### 2.1.- Sangre periférica

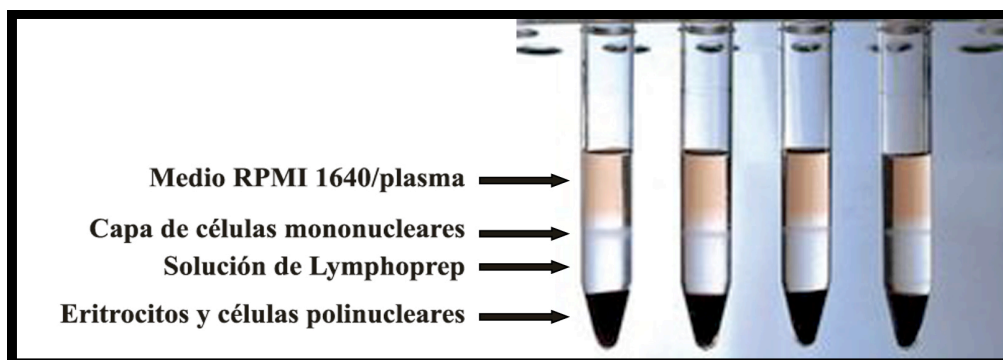
- *Separación de células mononucleares (CM)*: se recogieron 20 ml de sangre periférica en dos tubos secos con 0.3 ml de heparina sódica libre de conservantes (Rovi) (1000 UI/ml). La obtención de las células mononucleares se realizó mediante la técnica de

## Material y métodos

centrifugación en gradiente de densidad (1.077 g/ml), empleando la solución Lymphoprep™ (Larramendy y cols., 1998; Nowak y cols., 1999), según se describe a continuación (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 1).

En primer lugar, la muestra de sangre periférica se diluyó con RPMI 1640 (Gibco) en una proporción volumen/volumen (v/v), y se repartió en tubos cónicos estériles de 10 ml a los que previamente se había adicionado 4 ml de Lymphoprep™, dejándola resbalar lentamente por las paredes. Seguidamente se centrifugó durante 30 min a 1500 rpm y temperatura ambiente y la interfase celular blanquecina se recogió mediante una pipeta Pasteur estéril y se pasó a un nuevo tubo cónico estéril de 10ml, el cual se completó hasta el total de su capacidad con RPMI 1640 (Gibco) (Figura 6). A continuación se realizaron dos lavados, centrifugando durante 20 min y 10 min respectivamente a 1200 rpm y temperatura ambiente. Finalmente, el pellet celular se resuspendió en tampón PBS (Dulbecco's phosphate saline buffer) (Gibco) y se congeló a -80°C para la determinación de parámetros bioquímicos, o bien en medio RPMI y conservación a 4° C para el análisis FISH (véase apartado 3).

**Figura 6.-** Resultado de la centrifugación en gradiente de densidad con Lymphoprep™.



### 2.2.- Orina

Para la determinación de la base modificada oxidativamente 8-oxo-dG y los niveles de 8-Isoprostanos, se recogieron muestras de orina en un frasco estéril de 40 ml. Se alicuotaron en tubos eppendorf de 1 ml de capacidad, y se conservaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

### 2.3.- Aislamiento, cuantificación y digestión de ADN

- *Aislamiento del ADN:* Para el aislamiento de ADN se empleó el método descrito por Gupta (Gupta, 1984) con las modificaciones de Muñiz y colaboradores (Muñiz y cols.,

## Material y métodos

1995), donde se emplea la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico en lugar de fenol en la etapa de eliminación de proteínas (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 2).

Se partió de 300  $\mu$ l de células mononucleares resuspendidas en PBS, a los que se añadieron 2 ml de tampón de extracción de ADN Tris/CIH 1M, 150 mM NaCl, 2 ml de EDTA (pH 8.0), 50  $\mu$ l de proteinasa K (200  $\mu$ gr/ ml) (Sigma) y 100  $\mu$ l de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20 %, con el fin de lisar las membranas celulares. La muestra se incubó durante 30 min a 56°C y a continuación se dejó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se realizaron dos lavados a 3000 rpm durante 15 min con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), recuperando cada vez el sobrenadante de las dos fases obtenidas. A continuación se añadieron 200  $\mu$ l de NaCl 4M y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN. La muestra se guardó a -20°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y tras desechar el sobrenadante, se añadieron 2 ml de etanol al 70 %. Finalmente se realizó un lavado en las mismas condiciones anteriores, y tras decantar el sobrenadante, el ADN aislado se dejó secar y se resuspendió en 200  $\mu$ l de tampón Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 7.0).

- *Cuantificación del ADN:* Tras la precipitación del ADN se procedió a la cuantificación del mismo mediante un espectrofotómetro (Ultrospec 3000 pro UV/visible). Para ello se realizó una dilución 1:100 con agua bidestilada y se midió la absorbancia a una longitud de onda de entre 260 y 280 nm.

Sabiendo que 1 unidad de absorbancia de 260 nm ( $A_{260}$ ) equivale a 50  $\mu$ g/ml de ADN de doble cadena, se pudo calcular su concentración empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \times 100 \text{ (}\mu\text{l/ml)}$$

$A_{260}$  (Absorbancia a 260nm)

100 (factor de dilución)

La pureza del ADN extraído vino determinada por la relación:

$$A_{260} / A_{280} = 1.7 - 1.9$$

$A_{260}$ : absorbancia máxima de los ácidos nucleicos

$A_{280}$ : absorbancia máxima de las proteínas

## Material y métodos

- *Digestión de ADN:* Para la digestión enzimática del ADN obtenido se partió de un volumen de muestra de 200  $\mu$ l (5  $\mu$ g ADN/ $\mu$ l) al que se le añadieron 100 unidades de RNA-asa libre de DNA-asa (1  $\mu$ l) (Sigma), incubándose a 37°C durante una hora. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 100  $\mu$ l de DNA-asa I (100 unidades) (Sigma) y se incubó de nuevo a 37°C durante otra hora. A continuación se añadieron 15  $\mu$ l de acetato sódico 0.5 M (pH 5.1), 15  $\mu$ l de nucleasa P1 (5 unidades) (Sigma) y 30  $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> 10 mM (concentración final de 1 mM) y se incubó a 37°C durante otra hora. Tras neutralizar el pH de la mezcla con 100  $\mu$ l de Tris/HCl 0.4 M (pH 7.8), se añadieron 20  $\mu$ l de fosfatasa alcalina (3 unidades) (Sigma) y se incubó a 37°C durante una hora. Finalmente, el ADN digerido se empleó para la determinación de 8-oxo-dG por HPLC (apartado 4.2) (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 3).

### 3.- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

#### 3.1.- Preparación del material

Para el estudio mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se emplearon las células mononucleares resuspendidas en RPMI 1640 (Gibco) obtenidas según el apartado 2.1. Estas muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y se les eliminó el sobrenadante.

A continuación, el pellet celular se resuspendió con una solución hipotónica de CIK (Panreac) (0.075M) precalentado a 37°C, incubándose durante 12 min en un baño a 37°C. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm y temperatura ambiente, y tras eliminar el sobrenadante, se procedió a la fijación del material añadiendo solución de Carnoy en frío (3:1 metanol: ácido acético) (Merck) (Oscier y cols., 1990; Solé y cols., 1997) hasta completar un volumen de 10 ml/tubo, e incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 2-3 lavados centrifugando a 1000 rpm durante 10 min con la solución fijadora hasta conseguir que el material tuviera un aspecto blanquecino. Finalizado el último lavado, el botón celular se resuspendió en un volumen de Carnoy proporcional a la concentración de muestra obtenida y se almacenó a - 20 °C hasta su utilización (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 4).

Se realizaron extensiones del material cromosómico fijado sobre portaobjetos, los cuales se dejaron secar posteriormente en una plancha a 40°C durante un mínimo de 30 min.

Finalmente, se observaron las extensiones bajo un microscopio de contraste de fases (Nikon) con la finalidad de escoger áreas de hibridación con una concentración aproximada de 100 células/campo. Las áreas de hibridación escogidas se señalaron con un lápiz de punta de diamante.

### 3.2.- Sondas de ADN

Las sondas de ADN utilizadas para el análisis genético de los pacientes con LBM y LLC se describen a continuación:

- **CEP 12 SpectrumOrange** (Abbott Molecular Inc): Es una sonda de ADN marcada con fluorescencia de color anaranjado, complementaria de la secuencia de ADN alfa satélite situada en la región centromérica 12p11.1-q11. Dicha zona es rica en Adenina-Timina. Esta sonda se emplea para la detección de la trisomía 12 (Figura 7).

- **LSI D13S319 SpectrumOrange** (Abbott Molecular Inc): Es una sonda de ADN de secuencia única, marcada con fluorescencia de color anaranjado, comprende aproximadamente 130 Kb. La región con la cual hibrida es la comprendida entre el gen del retinoblastoma (*RB1*) y del locus *D13S25*, en la cual se estima la presencia de un posible gen supresor de tumores. Esta sonda abarca la banda 13q14.3 y se emplea para la detección de deleciones en dicha región (Figura 7).

- **LSI TP53 SpectrumOrange** (Abbott Molecular Inc): Es una sonda de ADN que comprende una región de aproximadamente unas 145 Kb en 17p13.1. Esta sonda es de secuencia única y se encuentra marcada con fluorescencia naranja. Se emplea para la detección de deleciones del gen *TP53* (Figura 7).

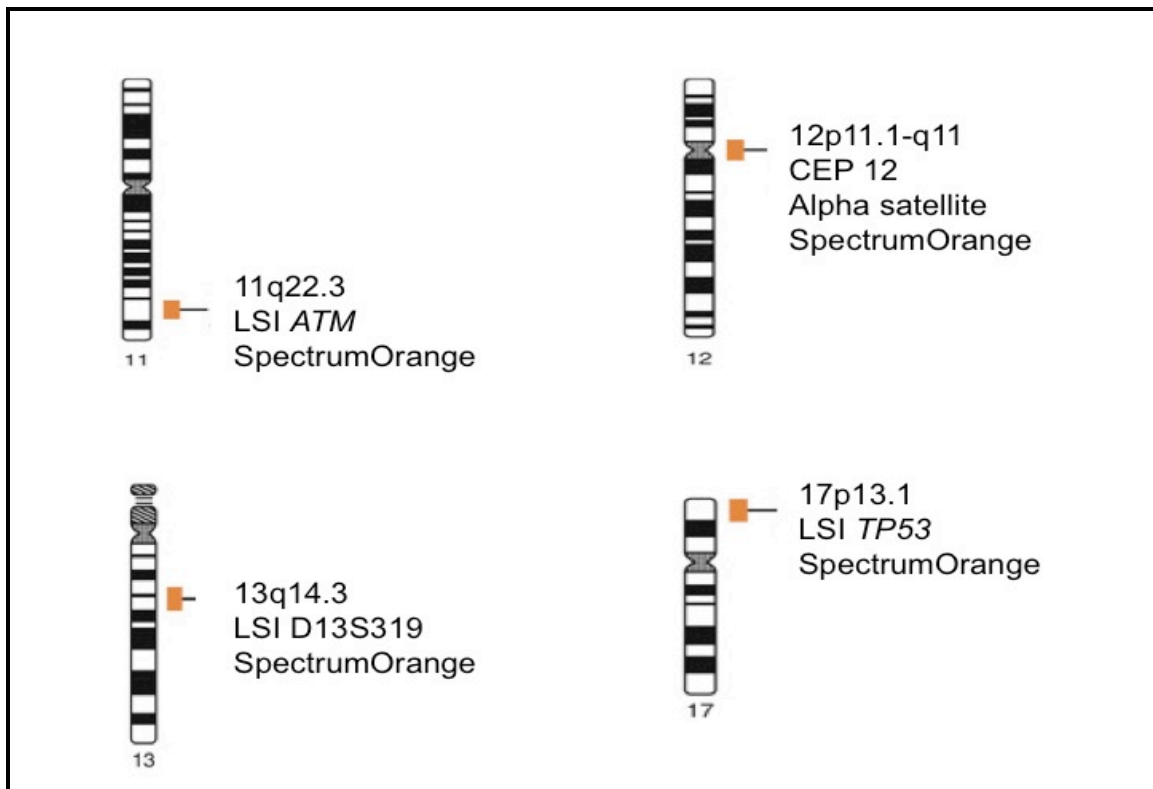
- **LSI ATM SpectrumOrange** (Abbott Molecular Inc): Es una sonda de ADN de secuencia única marcada con fluorescencia anaranjada. Su tamaño es de aproximadamente unas 500 Kb. La sonda hibrida con la región 11q22.3 del cromosoma 11, abarcando al gen *ATM* (*Ataxia Telangiectasia mutado*). Se utiliza para la detección de deleciones del gen *ATM* (Figura 7).

### 3.3.- Desnaturalización del ADN

Con el fin de conseguir ADN de simple cadena, tanto las muestras fijadas en los portaobjetos de estudio como las sondas fluorescentes empleadas, se desnaturalizaron mediante incubación de un minuto a 75°C en el sistema HYBrite™ (Vysis) (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 5).

## Material y métodos

**Figura 7.-** Representación esquemática de las zonas de hibridación de la sonda centromérica CEP 12 y de las sondas de secuencia única LSI *D13S319*, LSI *TP53* y LSI *ATM* (Abbott Molecular).



### 3.4.- Hibridación

En cada zona seleccionada se depositaron 10  $\mu$ l de una mezcla compuesta por 2  $\mu$ l de agua destilada, 7  $\mu$ l de tampón de hibridación (Abbott Molecular Inc) y 1  $\mu$ l de la sonda correspondiente. La sonda centromérica CEP 12 se comercializa premezclada con su tampón y lista para su uso directo.

A continuación, las áreas de hibridación se cubrieron con cubreobjetos de 22 mm x 22 mm, y se sellaron con pegamento Fixogum (Marabu).

Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### 3.5.- Lavados post-hibridación

Finalizado el tiempo de hibridación, y con el fin de eliminar la sonda no unida a la muestra, se realizaron una serie de lavados. En primer lugar, los preparados se introdujeron en una cubeta con la solución 0.4 x SSC (tampón citrato sódico salino) / 0.3% NP-40 (Nonidet P-40, detergente no iónico), precalentada en un baño a 73°C, donde se incubaron durante 2 min. Transcurrido este tiempo, se pasaron a otra cubeta que contenía

2 x SSC / 0.1 % NP-40 a temperatura ambiente, incubándose durante 1 min Finalmente, los portaobjetos se dejaron secar en oscuridad durante 15 min.

### 3.6.- Contraintinción

Las zonas de hibridación se tiñeron con 8 µl de DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindol) (125 ng/ml), se cubrieron con cubreobjetos 22 mm x 22 mm y se sellaron con Fixogum. Finalmente, los portaobjetos se conservaron a -20°C en oscuridad hasta su análisis.

### 3.7.- Interpretación de las señales

El análisis de las muestras se realizó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado con los filtros adecuados para la detección de las señales de fluorescencia de las distintas sondas de ADN empleadas. Se evaluaron un mínimo de 200 núcleos por cada muestra mediante el software Cytovision (Applied Imaging).

### 3.8.- Criterios de valoración de FISH y niveles de corte

Como controles negativos se emplearon muestras de sangre periférica procedentes de 10 individuos sanos. El punto de corte para considerar un caso positivo se estimó añadiendo tres desviaciones estándar a la media del porcentaje de células con tres señales (detección de trisomías), o con una señal (detección de deleciones) de las muestras control (Anastasi y cols., 1990; García-Marco y cols., 1996; Solé y cols., 2000).

## 4.- Determinación de parámetros de estrés oxidativo

### 4.1.- Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas presente en cada muestra se cuantificó siguiendo la técnica de Markwell y cols., 1978, modificación de la técnica de Lowry y cols., 1951. Su determinación es necesaria para normalizar los valores obtenidos de MDA, GSSG, GSH y la actividad de la enzima catalasa.

Se siguió el mismo procedimiento tanto para los patrones, de concentraciones conocidas de proteína, como para las muestras a analizar (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 6).

Para iniciar la reacción se añadió un volumen final de 1 ml de Lowry A + B, 1:1 a todas las muestras y los patrones (siendo A: 40 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 8 g de NaOH + 500 ml de agua destilada y B: 200 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O + 400 mg de tartrato sodio-potasio + 500 ml de agua destilada, debiéndose realizar la mezcla en el momento de su utilización). A

## Material y métodos

continuación, las muestras y los patrones se incubaron durante 10 min y transcurrido ese tiempo se añadieron 100 µl de Folin-Ciocalteu 1N (Merck) y se incubaron durante 30 min más. Seguidamente, se midieron las absorbancias a 750 nm. Con los datos obtenidos en la lectura de los patrones se construyó una recta patrón. Las concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) de los patrones estaban en el rango de 0-75 µg de BSA. Finalmente, se interpolaron en la recta patrón los valores de absorbancia obtenidos de las muestras y de esta manera se obtuvieron las concentraciones proteicas de las mismas.

### 4.2.- Determinación de 8-oxo- dG

- *En células mononucleares:* Los hidrolizados de ADN obtenidos según el protocolo descrito en el apartado 2.3 se disolvieron en un gradiente de agua HPLC y se filtraron a través de un filtro de 0.2 µm. A continuación, se inyectaron las muestras en una columna Waters ODS HPLC (2.5 x 0.46 i.d.; tamaño de poro 5 µm) a un flujo de 1ml/min.

La cantidad de 8-oxo-dG y deoxiguanosina (dG) en el ADN digerido se midió por detección electroquímica y ultravioleta (UV) respectivamente. También se analizaron patrones de dG y 8-oxo-dG para comprobar la correcta separación y poder identificar las bases derivadas del ADN celular.

- *En orina:* Para la determinación de la base mutagénica 8-oxo-dG en orina se siguió el método descrito por Espinosa y cols; 2007 (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 8). Se partió de 1 ml de orina la cual se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm. A continuación, el sobrenadante se recogió en nuevos eppendorfs, se le añadieron 100 µl de tampón Tris/EDTA 3 M (pH 8.6) y se mezcló durante 30 s con la ayuda de un vórtex. La solución obtenida se pasó a través de una columna Bond Elute C18(OH)SPE (lavada previamente con 3 ml de metanol y 3 ml de agua) y seguidamente se añadieron 9 ml del tampón 2.5 % acetonitrilo 1.5 % metanol en 10 mM de borato (pH 7.9). A continuación, la muestra se pasó a través de la columna de intercambio catiónico LCSCX (lavada previamente con 3 ml de metanol 80 % y 3 ml de tampón borato (pH 7.9)). La 8-oxo-dG se eluyó con 2 ml de tampón acetonitrilo/metanol en borato pH 6.0 con HCl 1M. Al eluyente se le añadieron 4 ml de diclorometano:isopropanol (1:1) y se mezclaron en el vórtex durante 30 s. Seguidamente, se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm y la capa acuosa superior se desechó dejando evaporar la capa inferior orgánica en una estufa seca a 50 °C (Theroven selecta). Finalmente la muestra se reconstituyó con 500 µl de fase móvil HPLC (tampón fosfato 50 mM pH 5.1) sin acetonitrilo y se inyectaron 50 µl en la columna de HPLC.



Los valores de 8-oxo-dG se expresaron en proporción a la concentración de creatinina en orina dados en nmol de 8-oxo-dG /mmoles creatinina.

Para la **determinación de la creatinina** se empleó el kit comercial de Spinreact (código: N° 1001111) (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 9). La determinación se inició diluyendo 10 veces la muestra de orina en agua destilada. Por cada muestra analizada se mezclaron 1ml del reactivo comercial (50 % de hidróxido sódico y 50 % de ácido pícrico) y 100 µl de la orina diluida. A continuación, se midió la absorbancia a 492 nm a los 30 y 60 segundos de haberse iniciado la reacción. Para el cálculo del blanco se sustituyeron los 100 µl de muestra por 100 µl del estándar suministrado en el kit (2 mg/dL). El resultado de la determinación se calculó mediante la siguiente fórmula y se expresa en moles/ml:

$$[\text{creatinina}] = \frac{A_m(60s) - A_m(30s)}{A_{bl}(60s) - A_{bl}(30s)} \times 2\text{mg/dL} \times 88.4 (\mu\text{mol/L}) \times 10 (\text{FD}) \times 10^6$$

FD= factor de dilución

### 4.3.- Determinación de la actividad del Glutati6n

- *Determinaci6n del Glutati6n Reducido (GSH):* Se parti6 de 50 µl de muestra (muestra obtenida seg6n el protocolo del apartado 2.3) a la que se le a6adieron 50 µl de tamp6n PCA GSH 12 % llevando la muestra a centrifugaci6n durante 5 min a 10.000 rpm. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se mezcl6 con 20 µl del colorante metacresol 10 mM.

Seguidamente, se ajust6 el pH con KOH 3M hasta obtener un pH 10 en el que la muestra vira a color violeta. Para medir el pH se utilizaron tiras de pH (Riedel-de H6en).

A continuaci6n se a6adieron 300 µl de fluoronitrobenceno 1 % (FDNB) y se incub6 en oscuridad durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, las muestras se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento mediante HPLC.

Previamente a su an6lisis, las suspensiones se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm y el sobrenadante se trasvas6 a viales para HPLC.

Para la construcci6n de la recta patr6n, se procesaron patrones de GSH de concentraciones conocidas (de 6.25 nmoles a 100 nmoles de GSH) y se analizaron por HPLC previamente a las muestras. Para el an6lisis mediante HPLC se emple6 una columna Waters ODS S5 NH<sub>2</sub> (0.052, 25 cm) y un flujo de 1 ml/min, y se sigui6 el m6todo descrito por Espinosa y cols., 2007 (véase ficha t6cnica anexo 2 protocolo 10).

## Material y métodos

- *Determinación del Glutati6n Oxidado (GSSG):* Para la determinaci6n del GSSG presente en la muestra, se parti6 de un volumen de 50 µl de c6lulas mononucleares al que se a±adieron 50 µl del tamp6n PCA GSSG 6 %.

La suspensi6n celular obtenida se centrifug6 a 10.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se trasvas6 a un nuevo eppendorf y se le a±adieron 50 µl del colorante metacresol 10 mM. Para una determinaci6n adecuada, se ajust6 el pH a 10 con la ayuda de KOH 3M. Para medir el pH se utilizaron tiras de pH (Riedel-de Hæen).

Llegados a este punto, se a±adieron 300 µl de FDNB 1 % a las muestras y se incubaron durante 4 h en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubaci6n, las muestras se dejaron secar durante toda la noche en estufa a 50°C (Theroven selecta). Al día siguiente, se resuspendieron con 300-400 µl de metanol al 80 % y se centrifugaron durante 5 min a 10.000 rpm. El sobrenadante se coloc6 en viales para HPLC para su determinaci6n.

Para la construcci6n de la recta patr6n, se procesaron patrones de GSSG de concentraciones conocidas (de 3.125 nmoles a 50 nmoles de GSH) y se analizaron por HPLC previamente a las muestras.

Para el análisis mediante HPLC se utiliz6 una columna Waters ODS S5 NH<sub>2</sub> (0.052, 25 cm) y un flujo de 1 ml/min y se sigui6 el m6todo descrito en Espinosa y cols., 2007(v6ase ficha t6cnica anexo 2 protocolo 11).

- *Estudio de la relaci6n GSSG/GSH:* La relaci6n entre el glutati6n oxidado y reducido es conocida como uno de los marcadores de estr6s oxidativo, por lo tanto fue uno de los parámetros importantes para nuestro estudio.

El cálculo del ratio se realiz6 de la siguiente forma:

$$\frac{\text{GSSG}}{\text{GSH}} \times 100$$

### 4.4.- Determinaci6n del Malondialdehido (MDA)

La concentraci6n de malondialdehido (MDA), considerada como un indicador de la peroxidaci6n lipídica, se determin6 como se describe a continuaci6n (v6ase ficha t6cnica anexo 2 protocolo 12).

Se parti6 de 50 µl de muestra (o patr6n) a la que se a±adieron 200 µl de tamp6n AcONa 2 M (pH 3.5) + TBA 0.2 %. Dicha mezcla se incub6 durante 60 min a 95 °C para conseguir la liberaci6n de las mol6culas de MDA, las cuales se conjugan con dos

moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), por lo tanto, se medirá MDA-TBA<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el tiempo la muestra se conservó en hielo.

A continuación, se añadieron 200 µl de tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 6.8) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recogieron 200 µl de sobrenadante y se mezcló con 200 µl de tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 3.5). Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 5 min en las mismas condiciones anteriores.

Para el análisis por HPLC se recogieron sobre 200-300 µl del sobrenadante en un vial.

Las condiciones cromatográficas fueron:

- Flujo: 1.2 ml/min
- Detección mediante detector UV- visible a 532 nm.
- Columna C-18 Spherisorb de 15 cm de longitud y 5 µm de diámetro.

### 4.5.- Determinación de la actividad enzimática de la catalasa

La determinación de la actividad catalítica de la enzima catalasa se realizó mediante espectrofotometría empleando el kit comercial de Cayman Chemical (Nº 707002) (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 13).

Las muestras de células mononucleares obtenidas según el apartado 2.1 se homogeneizaron en hielo con tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7.0) que contenía EDTA 1mM antes de iniciar la reacción. Los estándares de formaldehído se prepararon de 0 a 75 µM. A continuación, se añadieron a todos los pocillos de la placa 100 µl de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7.0) y 30 µl metanol. Seguidamente, se añadieron 20 µl de los estándares, del control positivo y de las muestras diluidas al pocillo correspondiente. Para iniciar la reacción se añadieron 20 µl peróxido de hidrógeno 0,035 M y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad en un agitador orbital. Transcurrido ese tiempo se detuvo la reacción con 30 µl/pocillo de hidróxido de potasio 10 M. Seguidamente, se añadieron 30 µl/pocillo del cromógeno 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4- triazole (Purald) el cual reacciona con el formaldehído producido en la reacción anterior. La muestra se incubó durante 10 min, a temperatura ambiente, oscuridad y en agitación. Transcurrido este tiempo se añadieron 10 µl/pocillo de una solución de periodato potásico en 0.5 M de hidroxido de potasio y se incubó durante 5 min más en las mismas condiciones. Finalmente, se leyó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Labsystems).

## Material y métodos

Las absorbancias obtenidas para cada muestra se interpolaron en una recta patrón obtenida con los estándares de concentración de formaldehído. El cálculo de la actividad de la enzima catalasa se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad catalasa} = \frac{\mu\text{M formaldehído muestra}}{20 \text{ min}} \times \text{dilución muestra} = \text{nmol/min/ml}$$

Una unidad catalítica de la enzima catalasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de formaldehído por minuto a 25 °C. Los valores se normalizaron con la concentración de proteínas de la muestra, y el resultado se expresó en U/mg proteína.

### 4.6.- Determinación de 8-isoprostanos

Los isoprostanos son una familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación de los tejidos lipídicos por radicales oxigénicos. Dentro de la familia de los isoprostanos destacar el 8-isoprostano (8-iso-PGF<sub>2α</sub>), propuesto como un marcador de la ineficacia de los sistemas antioxidantes y de estrés oxidativo.

Los niveles de 8-isoprostanos presentes en las muestras de orina de nuestros pacientes se determinaron extrayendo los 8-Isoprostanos de la orina mediante una columna de inmunoafinidad (número de catálogo 416358; Cayman Chemical Corp). Las alícuotas de 0,5 ml de orina se pasaron directamente a través de las columnas que fueron lavadas con 2 ml de tampón fosfato salino (PBS) 0,1 mol/L, seguido de dos lavados con 2 ml de agua. A continuación, las concentraciones de 8-isoprostanos se cuantificaron mediante un inmunoensayo empleando el kit comercial de Cayman Chemical (Nº 516351) (véase ficha técnica anexo 2 protocolo 14).

Para la determinación se emplearon las placas de 96 pocillos incluidas en el kit recubiertas con el anticuerpo *mouse anti-rabbit IgG*. Los estándares de 8-isoprostano se prepararon a unas concentraciones de 0,8 a 500 pg/ml. Se pipetearon 50 µl tanto de los estándares como de las muestras en los pocillos correspondientes. A continuación, se adicionaron 50 µl del conjugado de 8-isoprostano con acetilcolinesterasa, el cual compete con los 8-isoprostanos presentes en las muestras. Finalmente, se añadieron 50 µl del suero específico de 8-isoprostanos (el cual se une de forma simultánea tanto a los anticuerpos monoclonales unidos a la placa como a los 8-isoprostanos presentes en las muestras como a los conjugados con acetilcolinesterasa). Las placas se incubaron tapadas durante 18 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Transcurrido este tiempo, la placa se lavó 5 veces con el tampón de lavado y se añadieron 200 µl del

reactivo de Ellman (contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa) a todos los pocillos y 5  $\mu$ l del conjugado de 8-isoprostano con acetilcolinesterasa al pocillo de actividad total. La placa se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante un periodo de 90-120 min en un agitador orbital. Finalmente, se leyó en el lector de placas a 405 nm (Multiskan EX, Thermo Labsystems).

Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en una recta patrón y se normalizaron con la cantidad de creatinina presente en las muestras. Los datos se expresaron en ng de 8-isoprostano/mmol creatinina.

### 5.- Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa informático SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La distribución normal de los datos se analizó mediante el test de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre grupos se evaluaron usando los test de ANOVA, U de Mann-Whitney, t-student, Chi-cuadrado y de la mediana según la distribución normal o no paramétrica de los datos a analizar. Las variables categóricas se expresaron en porcentajes, y las variables continuas se expresaron como la mediana acompañada por el percentil 25 (Q1) y el percentil 75 (Q3) o bien como la media acompañada de la desviación típica. El valor de significación se estableció en un *p-valor* menor de 0.05.



# **Resultados y discusión argumental**





### IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN ARGUMENTAL

#### 1.- Características generales de los pacientes con LBM y LLC

El presente estudio se llevó a cabo en 29 pacientes diagnosticados de Linfocitosis B Monoclonal (LBM) y 55 pacientes diagnosticados de Leucemia Linfática Crónica B (LLC). Se incluyeron en el estudio un grupo de 39 individuos sanos con una mediana de edad de 66 años (rango 40-99 años) de los cuales 21 fueron varones (54 %) y 18 mujeres (46 %). Ningún paciente había recibido tratamiento en el momento del estudio.

Todos los pacientes y controles proporcionaron su consentimiento informado por escrito, y el estudio se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki.

Al inicio de nuestro estudio contábamos con 84 pacientes diagnosticados de LLC. Tras la publicación de los nuevos criterios diagnósticos en 2007, fue necesaria la reclasificación de los pacientes, pasando 29 de ellos (un 52 %) a clasificarse como LBM (Eichhorst y Hallek, 2007). De igual forma, otros grupos han reclasificado a sus pacientes de LLC (Marti y *co/s.*, 2005; Shanafelt y *co/s.*, 2008).

##### 1.1.- Datos clínico-biológicos en pacientes con LBM y LLC

Los datos clínico-biológicos de cada uno de los pacientes con LBM y LLC en el momento del estudio se encuentran en el anexo 1: tabla A y tabla B respectivamente. Un resumen de los mismos queda recogido en la tabla 9.

Tanto en LLC como en la LBM la prevalencia es mayor en hombres que en mujeres coincidiendo con los datos publicados en la bibliografía (Rawstron y *co/s.*, 2002; Ghia y *co/s.*, 2004).

En nuestro estudio no existieron diferencias entre ambos grupos de pacientes, en lo que a edad, sexo, LDH o contaje de neutrófilos se refiere. Como era de esperar el número de leucocitos y linfocitos fue significativamente superior en los pacientes con LLC ( $p < 0.001$ ). Además, el recuento de plaquetas ( $p = 0.018$ ) y los niveles de hemoglobina ( $p = 0.026$ ) fueron menores en los pacientes con LLC, mientras que los niveles de  $\beta_2$  microglobulina fueron superiores en estos pacientes (2.30mg/L) al compararlos con el grupo de LBM (1.80 mg/L).

Todos estos datos confirman que los pacientes con LLC poseen ciertas características clínico biológicas que les confieren mayor malignidad frente a los sujetos con LBM.

## Resultados y Discusión

Hoy por hoy, el único factor pronóstico independiente asociado con la LBM es el recuento de linfocitos, ya que las alteraciones citogenéticas y los genes de las inmunoglobulinas son similares a los hallados en el grupo de pacientes de LLC de buen pronóstico (Dagklis y cols., 2009).

**Tabla 9.-** Resumen de las características clínico-biológicas de los pacientes con LBM y LLC participantes en el presente estudio.

	LBM (n=29)		LLC (n=55)		p-valor
	(%)	Mediana (Q1-Q3)	(%)	Mediana (Q1-Q3)	
<b>Edad (años)</b>		74.00 (70.0-77.0)		71.00 (63.0-76.5)	$p=0.217^a$
<b>Sexo</b>					
<b>Hombres (%)</b>	65.5		54.5		$p=0.332^c$
<b>Mujeres (%)</b>	34.5		45.5		
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>		14.7 (13.7-15.2)		13.8 (12.7-14.7)	$p=0.026^a$
<b>Leucocitos (<math>\times 10^9/l</math>)</b>		12.0 (9.8-13.4)		28.6 (18.6-55.7)	$p<0.001^b$
<b>Linfocitos (<math>\times 10^9/l</math>)</b>		6.3 (5.1-7.3)		23.2 (13.5-52.1)	$p<0.001^b$
<b>Neutrófilos (<math>\times 10^9/l</math>)</b>		4.9 (3.9-5.7)		4.2 (3.4-6.5)	$p=0.601^a$
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9/l</math>)</b>		227.0 (194.0-259.0)		189.0 (151.0-234.5)	$p=0.018^a$
<b>LDH (U/l) *</b>		369.0 (351.0-402.0)		358.0 (303.5-436.5)	$p=0.251^b$
<b><math>\beta_2</math>- microglobulina (mg/l)</b>		1.8 (1.5-2.5)		2.3 (1.5-2.9)	$p=0.012^b$

\*LDH: enzima lactato deshidrogenasa; LBM: linfocitosis B monoclonal; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75.

<sup>a</sup> Prueba U de Mann Whitney

<sup>b</sup> Prueba de la mediana

<sup>c</sup> Test  $\chi^2$

▪ **Estadios de Binet:** Entre los pacientes con LLC, de acuerdo con la clasificación de Binet (Binet y cols., 1981), el 89.1 % de los pacientes (49 casos) estaban en un estadio A, el 9.1 % (5 casos) en un estadio B y el 1.8 % (1 caso) en estadio C (Tabla 10).

▪ **Morfología de los linfocitos B:** 44 pacientes (80.0 %) mostraron una morfología típica de LLC, es decir, mostraron linfocitos pequeños y de aspecto maduro. En 11 casos (20.0%), se observaron células con hendiduras nucleares o formas linfoplasmocíticas en un porcentaje superior al 10 % (LLC atípicas) (Tabla 10).

**Tabla 10.-** Resumen de las características clínico-biológicas cualitativas de los pacientes con LLC.

	Nº de casos	%
<b>Estadio Binet*</b>		
<b>A</b>	49	89.1
<b>B</b>	5	9.1
<b>C</b>	1	1.8
<b>Morfología</b>		
<b>Típica</b>	44	80.0
<b>Atípica</b>	11	20.0
<b>CD38**</b>		
<b>Negativo</b>	33	73.4
<b>Positivo</b>	12	26.6
<b>ZAP70**</b>		
<b>Negativo</b>	15	40.6
<b>Positivo</b>	22	59.4

\* Binet y cols., 1981.

\*\* CD38 positivo  $\geq$  30%; ZAP70 positivo  $\geq$  20%.

▪ **Datos inmunofenotípicos:** Se pudieron recoger datos sobre la expresión de CD38 en 45 de los pacientes de LLC, siendo CD38 positivo el 26.6 % de los pacientes analizados (12 casos) (Tabla 10).

Respecto a la expresión de ZAP-70, de los 37 casos con LLC estudiados, el 22 % mostraron positividad en un porcentaje superior al 20 % de células, considerado el punto de corte (Tabla 10).

### 1.2.- Datos clínico-biológicos en el grupo control

Se seleccionó un grupo de individuos sanos (grupo control) que cumpliera los siguientes requisitos: no padecer ninguna enfermedad en el momento de la recogida de la muestra, no tomar medicación que pueda influir en la medición de los parámetros bioquímicos del estudio, no ser fumador habitual y poseer las mismas características generales que el grupo de pacientes a analizar, perteneciendo al mismo rango de edades y sexo. Con anterioridad a la inclusión de los individuos control en el estudio se comprobó que los parámetros clínicos de sus analíticas estaban dentro de los niveles normales establecidos por el laboratorio de análisis clínicos.

En los primeros estudios realizados para determinar la prevalencia de la LBM en la población sana sin historia oncológica ni hematológica ésta oscilaba entre el 5 y el 6.6 % (Rawstron y cols., 2002; Paolo Ghia y cols., 2004; Dagklis y cols., 2009). Posteriormente,

## Resultados y Discusión

Nieto y colaboradores describieron una prevalencia del 12 %, esta diferencia observada se debe en parte a la técnica citométrica empleada. Utilizaron un panel de 8 colores en lugar de los 4 o 5 empleados por el resto de grupos, aumentando por lo tanto la especificidad (Nieto y cols., 2009).

## 2.- Alteraciones citogenéticas

### 2.1.- Resultados FISH individuos control

Con el fin de establecer el límite de positividad de las diferentes sondas se hibridaron 10 muestras de individuos sanos con las sondas CEP12, LSI D13S319, LSI *TP53* y LSI *ATM* (Vysis) (Tabla 11).

Una vez realizada la hibridación sobre las muestras control se establecieron los puntos de corte mediante la fórmula del límite de positividad:

**Límite de positividad**= media de células con alteración + 3 veces la desviación típica

Los casos analizados se consideraron como trisómicos cuando el porcentaje de células con tres señales superó el 3%. Las deleciones del gen *TP53*, del gen *ATM* y del locus D13S319 se consideraron positivas cuando el número de células con una señal fue mayor del 10, 12 y del 13 % respectivamente.

**Tabla 11.-** Resultados de FISH en 10 individuos sanos con las sondas CEP12, LSI D13S319, LSI *TP53* y LSI *ATM*.

ALTERACIÓN	Nº de casos	Media de células positivas (%)	Desviación típica	Límite de positividad* (%)
+ 12	10	1.1	0.6	3
Del 13q	10	4.4	2.8	13
Del 11q	10	3.5	2.8	12
Del 17p	10	2.7	2.1	10

\* Límite de positividad: media de células con alteración + 3 x desviación típica.

### 2.2.- Resultados FISH en pacientes con LBM

Las muestras de los pacientes diagnosticados de LBM se analizaron mediante FISH con un panel de sondas compuesto por CEP12, LSI D13S319, LSI *TP53* y LSI *ATM* y los resultados se presentan en la figura 8 (Tabla 12).

**Tabla 12.-** Frecuencias de alteraciones citogenéticas analizadas mediante FISH en la linfocitosis B monoclonal (LBM) y en la leucemia linfática crónica (LLC).

	Del(13q14)	Trisomía 12	Del(11q22)	Del(17p13)	FISH normal
<b>LBM</b>	24 % (7/29)	14 % (4/29)	0 % (0/29)	0 % (0/29)	62 % (18/29)
<b>LLC</b>	32 % (18/55)	15 % (8/55)	11 % (6/55)	11 % (6/55)	31 % (17/55)

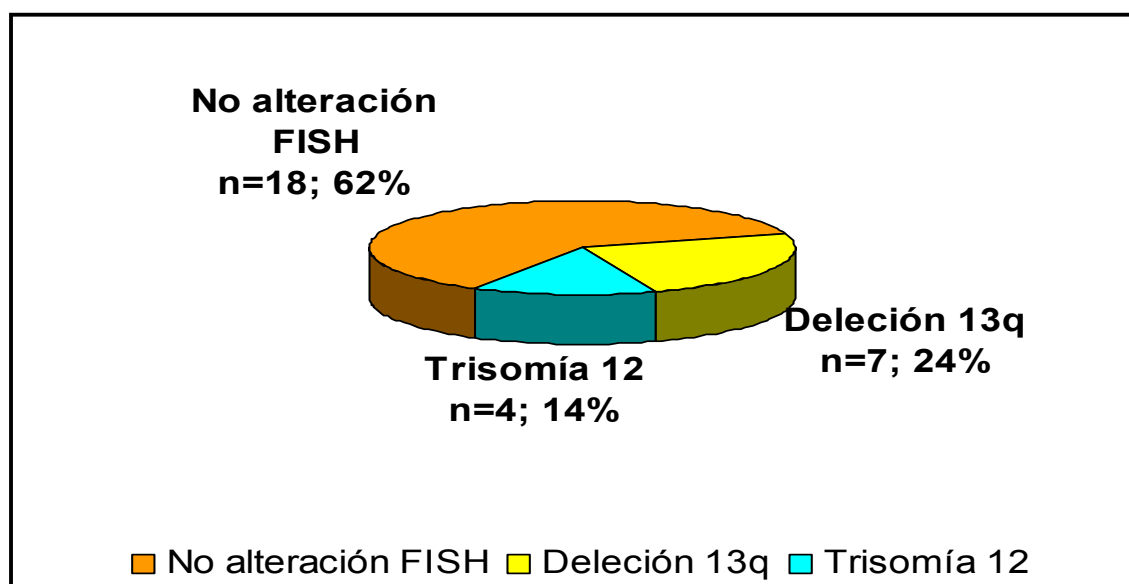
LBM: linfocitosis B monoclonal; LLC: leucemia linfática crónica

De los 29 pacientes estudiados, 18 (62.1 %) no presentaron ninguna de las alteraciones analizadas, en 7 casos (24.1 %) se detectó una deleción en el cromosoma 13 y en 4 casos (13.8 %) las células analizadas presentaban trisomía del cromosoma 12.

Ninguna de las muestras analizadas pertenecientes a pacientes con LBM presentó la deleción del gen *ATM* o del gen *TP53*, asociadas a un mal pronóstico en la LLC.

El subgrupo citogenético denominado “No alteración FISH” incluye a todos los pacientes con LBM (o pacientes con LLC, apartado 2.3) no portadores de ninguna de las alteraciones citogenéticas analizadas mediante la técnica de FISH. No se descarta en ningún caso que dichos pacientes pudieran ser portadores de otras alteraciones genéticas diferentes a las estudiadas.

**Figura 8.-** Anomalías cromosómicas en los pacientes afectos de LBM.



## Resultados y Discusión

Tanto en nuestro grupo de pacientes como en los publicados por otros autores (Döhner y cols., 2000; Lanasa y cols., 2008, 2011; Rawstron y cols., 2008; Nieto y cols., 2009; Shanafelt y Hanson, 2009; Fazi y cols., 2011), observamos que los marcadores citogenéticos asociados a mal pronóstico en la LLC (deleción del gen *ATM* y *TP53*) no aparecen o lo hacen con una baja frecuencia en los pacientes con LBM. Cuando aparecen dichas alteraciones nunca lo hacen en una proporción superior al 20 % y generalmente van asociadas a un aumento en el recuento linfocitario de dichos pacientes (Rawstron y cols., 2008).

Rossi en 2009 comparó el grupo de LBM con el de LLC Rai 0 y publicó que los pacientes con LBM poseen una menor incidencia de alteraciones citogenéticas que confieren mal pronóstico (*del11q22-q23/del17p13*), un 3.8 % frente al 15.2 % respectivamente (Rossi y cols., 2009). En nuestro estudio las proporciones de las diferentes alteraciones variaron respecto a las publicadas pero puede deberse a que nuestro grupo de estudio incluía únicamente a 29 pacientes.

El grupo de Landgreen en 2009 concluyó que la LLC siempre va precedida por LBM desde 6 meses hasta 6 años antes de desarrollar la leucemia de manera clínica, sea cual sea el estado mutacional de los genes de las inmunoglobulinas (Landgren y cols., 2009). También es importante destacar que no solo las LBM clínicas poseen alteraciones citogenéticas.

Podemos hablar de dos grupos de LBM, las que poseen linfocitosis y las que no. Se ha realizado una comparación entre ambos grupos y pacientes con LLC, y lo que se ha observado es que existe un aumento de frecuencias de aparición de alteraciones citogenéticas desde el grupo de la LBM sin linfocitosis, al grupo de LBM con linfocitosis hasta llegar al grupo de LLC. Este estudio refuerza la hipótesis de progresión desde un estado al otro acompañada de adquisición de alteraciones citogenéticas (Rawstron y cols., 2007; Nieto y cols., 2009; Henriques y cols., 2013). La adquisición de estos cambios a nivel genético puede estar potencialmente asociado con un aumento de la proliferación y/o supervivencia de las células de la LBM con fenotipo de LLC.

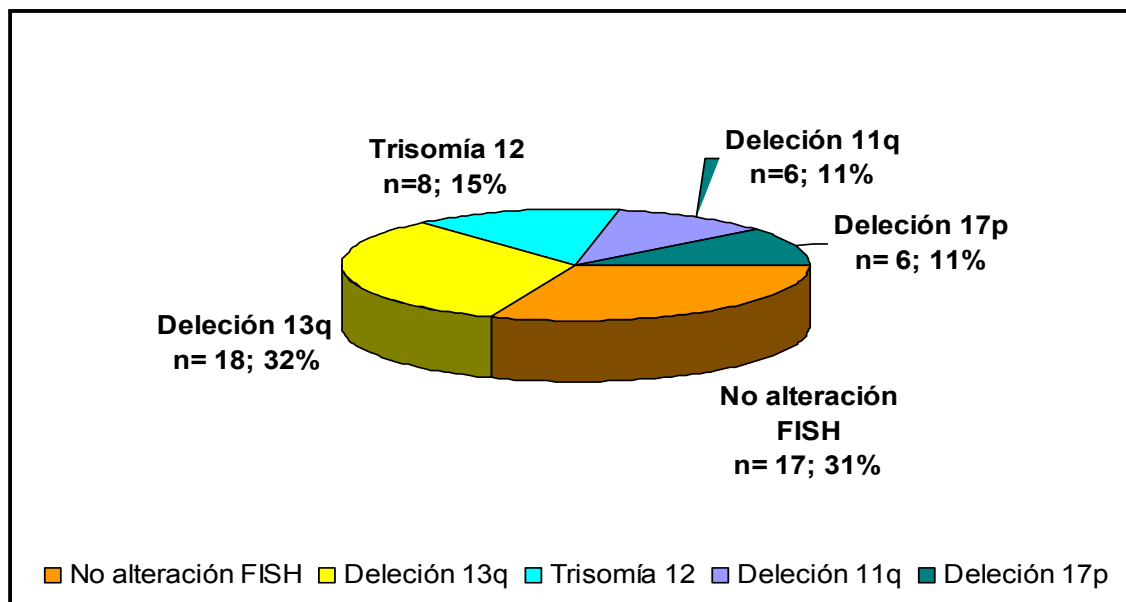
Estudios recientes han revelado que en un 10 % de los casos de LLC en el momento del diagnóstico el proto-oncogen *NOTCH1* se encuentra mutado, aumentando esta frecuencia en las fases más avanzadas de la enfermedad. Hoy por hoy, existen grupos de investigación que tratan de analizar si esta mutación también es detectable en los casos de LBM. El grupo de Rasi en 2012 observó un 3,2 % de mutaciones del gen *NOTCH1*, inferior a la tasa hallada en la LLC como era de esperar (Rasi y cols., 2012). De igual manera, se han realizado estudios del gen *SF3B1* en LBM, ya que en aproximadamente

un 5 % de los casos de LLC está presente y se ha asociado a mal pronóstico en estos pacientes. Los datos obtenidos fueron que únicamente un 1.5 % de los pacientes con LBM fenotipo LLC presentaron la mutación (Greco y Capello, 2013). Estos estudios refuerzan la idea de que la LBM se caracteriza por un fenotipo indolente.

### 2.3.- Resultados FISH en pacientes con LLC

De los 55 pacientes analizados, el 69 % presentaron alguna de las alteraciones citogenéticas estudiadas como se refleja en la figura 9 y figura 10 (Tabla 12).

**Figura 9.-** Anomalías cromosómicas en los pacientes afectos de LLC.

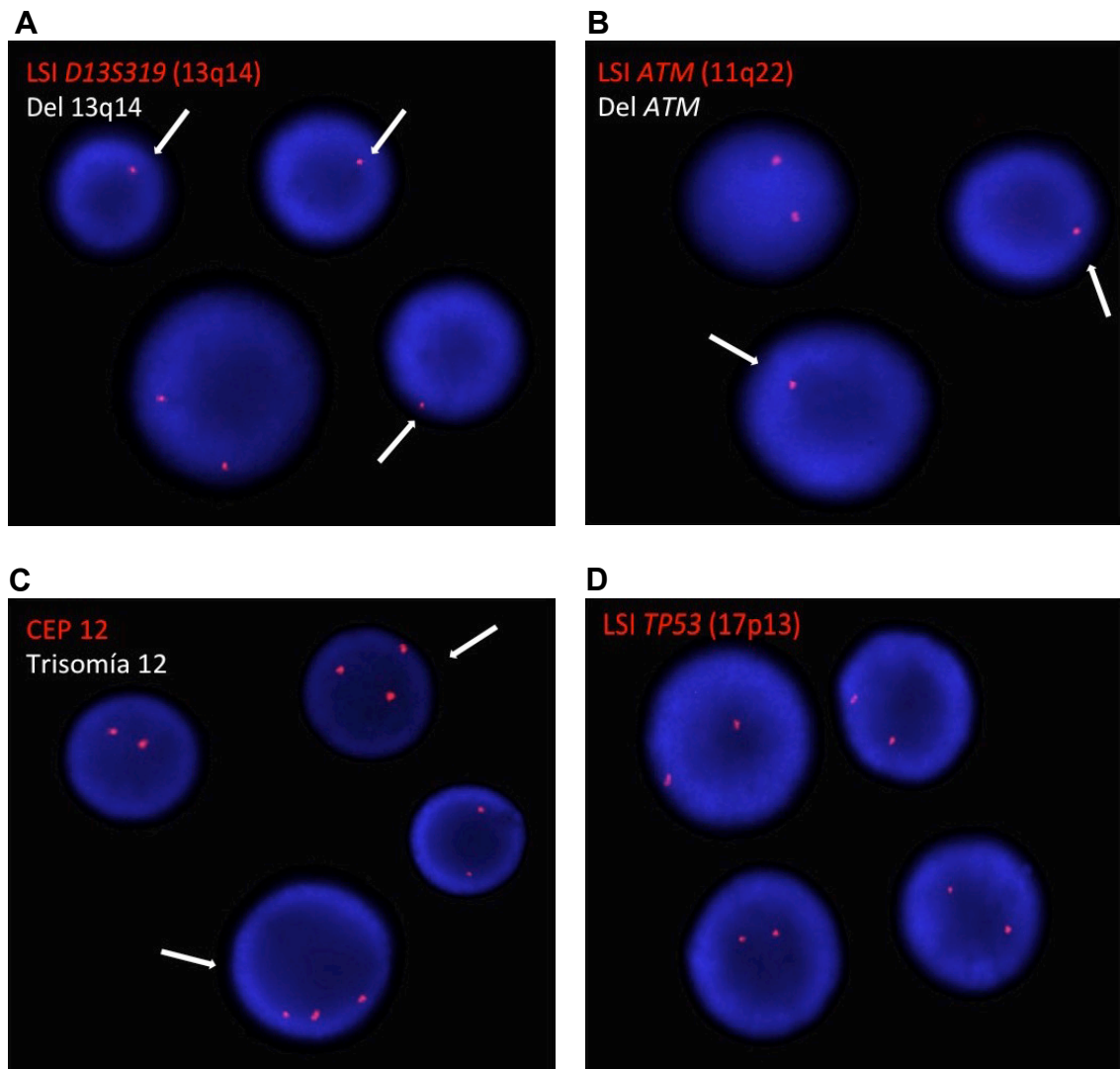


Se detectó deleción del cromosoma 13 en 18 de los pacientes (32.7 %) a pesar de que en la bibliografía se ha descrito en más de un 55 % (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007). Cuando se presenta como única alteración, ésta se asocia a un pronóstico favorable, presentando incluso una supervivencia superior al grupo de pacientes con cariotipo normal (Döhner y cols., 2000). Sin embargo, se ha publicado que el número de células portadoras de del13q influye en el curso clínico del paciente, por lo tanto el grupo de pacientes con deleción 13q14 no es tan homogéneo como se pensaba (Hernández y cols., 2009; Van Dyke y cols., 2010; Dal Bo y cols., 2011). Esta deleción también aparece en otros tipos de cáncer como el linfoma del manto (50 %), el mieloma múltiple (30 %), el cáncer de próstata (60 %) y en tumores pituitarios. Todos estos cánceres tienen una región común mínima sugiriendo un papel patogénico del gen(es) deleciónado(s) (Ng y cols., 2007; Nicoloso y cols., 2007). Los genes localizados en 13q pueden ser los

## Resultados y Discusión

responsables de la patogénesis de la enfermedad, e incluso de la heterogeneidad del pronóstico (Puiggros y cols., 2014).

**Figura 10.-** Imágenes de FISH en interfase. **(A)** Delección 13q14 detectada mediante la sonda LSI *D13S319* Spectrum Orange **(B)** Delección *ATM* (11q22) detectada mediante la sonda LSI *ATM* Spectrum Orange **(C)** Trisomía 12 detectada mediante la sonda CEP 12 Spectrum Orange **(D)** Ausencia de delección *TP53* (17p13), muestra hibridada con la sonda LSI *TP53* Spectrum Orange. Sondas de Abbott Molecular.



La trisomía del cromosoma 12 se detectó en 8 de los pacientes analizados (14.5 %) coincidiendo con el 15 % publicado (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007). La mediana de supervivencia de los pacientes que presentan trisomía 12 es de 114 meses (Döhner y cols., 2000). Recientemente se han asociado las mutaciones del gen *NOTCH1* a pacientes con trisomía 12, especialmente en aquellos grupos con mal pronóstico (genes



*IGHV* no mutados y/o ZAP70 +). La alta frecuencia de estas mutaciones podría explicar el mal pronóstico de un subgrupo de pacientes con trisomía 12 y la heterogeneidad del curso clínico de dichos pacientes (Gattei y cols., 2008; Quijano y cols., 2008; Balatti y cols., 2012; Puiggros y cols., 2014). Las células leucémicas con trisomía 12 se acompañan de otras anomalías complejas, aunque en nuestro estudio se ha detectado como única alteración. Suelen asociarse con una morfología atípica y/o prolinfocítica y suelen presentarse con mayor frecuencia en casos de LLC no mutados. La trisomía 12, es frecuente en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y con altos índices de proliferación celular y linfadenopatía marcada (Cuneo y cols., 1992; Que y cols., 1993; Hernández y cols., 1995; García-Marco y cols., 1996; Matutes y cols., 1996; Döhner y cols., 2000).

La delección del gen *ATM* se detectó en el 11 % de los pacientes, resultados coherentes con los publicados donde se estima una incidencia entre el 12 y el 18 % (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007). En la región delecionada 11q22-23 se encuentra el gen supresor de tumores *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), pero no todos los casos con delección 11q presentan el gen mutado, por lo que otros genes deben estar implicados en la patobiología de estos pacientes (Stilgenbauer y cols., 1996; Döhner y cols., 1997; Karhu y cols., 1997; Schaffner y cols., 1999; Zhu y cols., 1999). El gen *ATM* codifica para una proteína que actúa en la ruta de *TP53* en respuesta al daño celular, por lo tanto, su mutación o delección tendrá efectos sobre la apoptosis mediada por esta ruta de señalización. La del(11q) se asocia a resistencia al tratamiento quimioterápico convencional, y aquellos casos en los que se pierden ambas copias del gen o las presentan mutadas, muestran una peor respuesta a la irradiación y a la exposición de drogas citotóxicas, y por tanto, una peor supervivencia global (Austen y cols., 2007). La delección 11q es una alteración primaria ya que se detecta en el momento del diagnóstico. Los pacientes portadores suelen ser más jóvenes (<55 años) y presentan estados avanzados de la enfermedad, un mayor grado de linfadenopatía y una mediana de supervivencia de 79 meses (Fegan y cols., 1995; Döhner y cols., 1997, 2000; Stilgenbauer y cols., 2000). La expresión de moléculas de adhesión está reducida en pacientes con 11q- (Sembries y cols., 1999). Otros genes incluidos en la mínima región delecionada, de 11q22.3 a 11q23.1 son *RDX*, *FRDX1*, *RAB39*, *CUL5*, *ACAT*, *NPAT*, *KDEL2*, *EXPH2*, *MRE11*, *H2AX* y *BIRC3*. El gen *BIRC3* se ha descrito en un 24% de los pacientes refractarios a fludarabina (Rossi y cols., 2012). Estudios realizados mediante *arrays* han revelado que existe una minoría de pacientes portadores de la delección 11q que no engloba el gen *ATM* (Gunn y cols., 2009).

## Resultados y Discusión

En este estudio se detectó la delección del gen *TP53* en un 11 % de los pacientes analizados. En la bibliografía se ha publicado una incidencia de un 3-8 % de los pacientes con LLC, abarcando la región 17p10-p11.2 (Döhner y cols., 2000; Delgado y cols., 2012). Los pacientes portadores de del(17p) son clasificados en el grupo de mal pronóstico, aunque estudios recientes han demostrado que existe una gran heterogeneidad en este grupo de pacientes según el momento de aparición de la delección. Los pacientes con la del(17p) *de novo* (2-4 %) muestran una mediana de supervivencia entre 4-5 años respecto a los pacientes con la delección adquirida durante la evolución clonal, particularmente en pacientes que han recibido tratamiento, cuya mediana de supervivencia oscila entre 1-1,5 años (Tam y cols., 2009). El porcentaje de núcleos con la delección 17p es importante a la hora de establecer subgrupos de riesgo, estableciéndose el punto de corte en el 25 % de los núcleos analizados (Catovsky y cols., 2007; Tam y cols., 2009; Oscier y cols., 2010; Delgado y cols., 2012). Los pacientes con del(17p) suelen presentar un inmunofenotipo atípico y también se han asociado a un aumento en la expresión de CD38, ZAP-70 e *IGHV* no mutada, confiriéndoles un mal pronóstico (Krober, 2006; Quijano y cols., 2008; Rassenti y cols., 2008).

La mutación del gen *TP53*, localizado en 17p13.1, se ha detectado entre un 5 y un 10 % de los casos de LLC-B mediante técnicas moleculares (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007). Las mutaciones o anomalías de este gen desempeñan probablemente un papel patogénico en casi la mitad de los cánceres humanos. Dicho gen codifica para una fosfoproteína p53, la cual tiene un papel central en la regulación del ciclo celular, en la reparación del ADN y en la apoptosis frente a situaciones de estrés o daño celular (Mowat, 1998; Bargonetti y Manfredi, 2002). La mutación de *TP53*, acompañada o no por la del17p, es un factor pronóstico independiente y se asocia a una menor supervivencia global (32 meses) y menor tiempo libre de progresión, resistencia al tratamiento quimioterápico convencional y transformación a síndrome de Richter (Döhner y cols., 2000; Zenz, Benner, y cols., 2008; Zenz y cols., 2010).

Los pacientes portadores de la del(17p) y/o mutación de *TP53* no responden a los tratamientos estándar basados en fludarabina-ciclofosfamida-rituximab establecidos para los pacientes con LLC. Por lo tanto deben seguirse otras líneas de tratamiento como el Ibrutinib que es un inhibidor de la tirosina kinasa de Bruton (BTK) y fármacos independientes de p53. Para pacientes en remisión completa se recomienda el trasplante alogénico de células madre (Jain y O'Brien, 2012; Jain y cols., 2015).

La disfunción del factor nuclear p53 puede deberse a la sobreexpresión del gen *MDM2*, una ubiquitina ligasa específica de p53 encargada de la degradación de p53 y que

se encuentra sobreexpresada en un 50-70 % de los pacientes (Koníková y Kusenda, 2003). La inactivación del gen *ATM* también puede provocar un mal funcionamiento en la ruta de p53 (Pettitt y cols., 2001).

En resumen, la bibliografía describe unas incidencias de más del 50 % para la deleción 13q, entre un 10 y un 20 % para la trisomía 12, entre un 5 y un 20 % para la deleción 11q y la deleción de 17p está presente entre el 2 y el 15 % (Döhner y cols., 2000; Haferlach y cols., 2007; Rossi y cols., 2009). Por lo tanto, nuestro grupo de pacientes, a pesar de ser reducido, es bastante representativo como grupo de LLC respecto a las alteraciones FISH que presentan.

Cabe destacar, que las alteraciones presentes en los pacientes analizados se presentaron como alteración única, no existiendo ningún paciente portador de más de una alteración.

Finalmente, destacar que en 2012 se publicó un estudio donde se incluían 298 pacientes diagnosticados de LBM y se les comparó con un grupo de 356 pacientes diagnosticados de LLC. No encontraron una separación clara de ambas identidades, describiendo que las alteraciones citogenéticas no están restringidas sólo al grupo de LLC. Por lo tanto, se concluyó que LLC y LBM son procesos similares excepto por las masas tumorales (Kern y cols., 2012).

### 3.- Descripción del estatus oxidativo en la LBM y LLC

Debido al metabolismo aerobio de las células vivas, éstas producen una serie de metabolitos oxigénicos, los cuales si no pueden ser eliminados o metabolizados por el propio sistema celular, pueden dañar a la célula. Este daño puede ser a nivel lipídico, proteico o afectar incluso al propio material genético.

El término estrés oxidativo engloba los efectos nocivos que las especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres ejercen sobre las estructuras celulares (Sies y Cadenas, 1985). Por lo tanto, el estrés oxidativo está relacionado con la fisiopatología de enfermedades degenerativas, incluyendo tanto los procesos de envejecimiento como el cáncer.

Nuestro trabajo se basó en el análisis del daño oxidativo en los grupos de pacientes con LBM y LLC mediante la cuantificación de los productos generados por el ataque de los radicales libres sobre las diferentes estructuras celulares. Debido a la reciente aceptación sobre que la LBM puede ser una condición previa al hecho de padecer LLC,

## Resultados y Discusión

nuestro trabajo examinó el estatus oxidativo de la LBM con el fin de determinar si dicho daño ya se encuentra en ese momento o se desarrolla en la LLC.

Hasta la actualidad, no se han publicado estudios donde se evalúa el daño oxidativo en los pacientes con LBM, por lo tanto no tenemos datos para comparar nuestros resultados.

Basándonos en estudios previos, lo que sí sabemos es que las células de la LLC son deficientes en enzimas antioxidantes y consecuentemente acumulan tanto especies reactivas del oxígeno como del nitrógeno (Ferraris y cols., 1994; Oltra y cols., 2001; Bakan y cols., 2003).

Los valores de los parámetros de estrés oxidativo que se obtuvieron para los distintos grupos de pacientes y el grupo control se muestran en la tabla 13.

### 3.1.- Estudio del daño oxidativo del ADN: determinación de 8-oxo-dG

Una parte importante de nuestro trabajo fue el análisis de la oxidación del ADN y su reparación. El daño oxidativo en el ADN se valoró cuantificando la base mutagénica 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG), ya que se forma rápidamente cuando existe daño oxidativo, siendo así un potente indicador de carcinogénesis (Valavanidis y cols., 2009).

Nuestros resultados mostraron que los niveles de 8-oxo-dG se encuentran significativamente incrementados tanto en la población de células mononucleares ( $39.5 \text{ 8-oxo-dG}/10^6 \text{ dG}$ ) como en la orina ( $15.1 \text{ nmol 8-oxo-dG}/\text{mmol creatinina}$ ) de los pacientes con LBM respecto a los valores obtenidos en los sujetos control ( $6.1 \text{ 8-oxo-dG}/10^6 \text{ dG}$  y  $11.0 \text{ nmol 8-oxo-dG}/\text{mmol creatinina}$ ) ( $p < 0.001$  para ambas determinaciones) (ver figura 11).

En el grupo de pacientes con LLC también existió un aumento significativo de los niveles de 8-oxo-dG tanto en los linfocitos leucémicos ( $48.4 \text{ 8-oxo-dG}/10^6 \text{ dG}$ ) como en las muestras de orina ( $14.6 \text{ nmol 8-oxo-dG}/\text{mmol creatinina}$ ) cuando se compararon con los niveles presentes en los sujetos control ( $6.1 \text{ 8-oxo-dG}/10^6 \text{ dG}$  y  $11.0 \text{ nmol 8-oxo-dG}/\text{mmol creatinina}$ ) ( $p < 0.001$  para ambas determinaciones).

Cuando se compararon los datos obtenidos en los niveles de 8-oxo-dG del grupo con LBM frente a los del grupo de LLC no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, ni en la cantidad presente en los linfocitos ni en la excretada en orina ( $p = 0.251$  y  $p = 0.782$  respectivamente) (Tabla 13 y figura 11).

**Tabla 13.- Valores de estrés oxidativo en sujetos sanos y pacientes diagnosticados de LBM y LLC.**

	Controles (1) n=31 Mediana (Q1-Q3)	LBM (2) n=29 Mediana (Q1-Q3)	LLC (3) n=55 Mediana (Q1-Q3)	<i>p</i> -valor		
				(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(2) vs. (3)
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	6.1 (5.7-7.8)	39.5 (35.4-51.0)	48.4 (35.6-57.8)	<i>p</i> <0.001 <sup>b</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>b</sup>	<i>p</i> =0,251 <sup>b</sup>
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	11.0 (7.3-11.9)	15.1 (9.6-28.7)	14.6 (10.1-23.7)	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.782 <sup>a</sup>
<b>8-isoprostanos</b> (ng/mmol creatinina)	88.2 (80.4-105.3)	90.0 (46.2-132.8)	72.2 (52.5-94.7)	<i>p</i> =0.345 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.691 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.293 <sup>a</sup>
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	0.4 (0.3-0.4)	1.2 (0.6-1.7)	1.1 (0.6-1.8)	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.587 <sup>a</sup>
<b>GSH</b> (nmol/mg prot)	24.7 (22.6-27.3)	26.7 (24.1-30.0)	27.3 (24.8-33.2)	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.337 <sup>a</sup>
<b>GSSG</b> (nmol/mg prot)	1.6 (1.2-1.6)	2.8 (1.7-3.9)	2.5 (2.0-3.7)	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.814 <sup>a</sup>
<b>GSSG/GSH %</b>	5.8 (5.7-5.9)	10.4 (6.2-14.7)	9.2 (6.0-13.8)	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.624 <sup>a</sup>
<b>Catalasa</b> (U/mg prot)	46.4 (32.4-64.7)	26.4 (21.6-38.8)	25.0 (21.3-33.3)	<i>p</i> =0.002 <sup>a</sup>	<i>p</i> <0.001 <sup>a</sup>	<i>p</i> =0.869 <sup>a</sup>

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; LBM: linfocitosis B monoclonal; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75

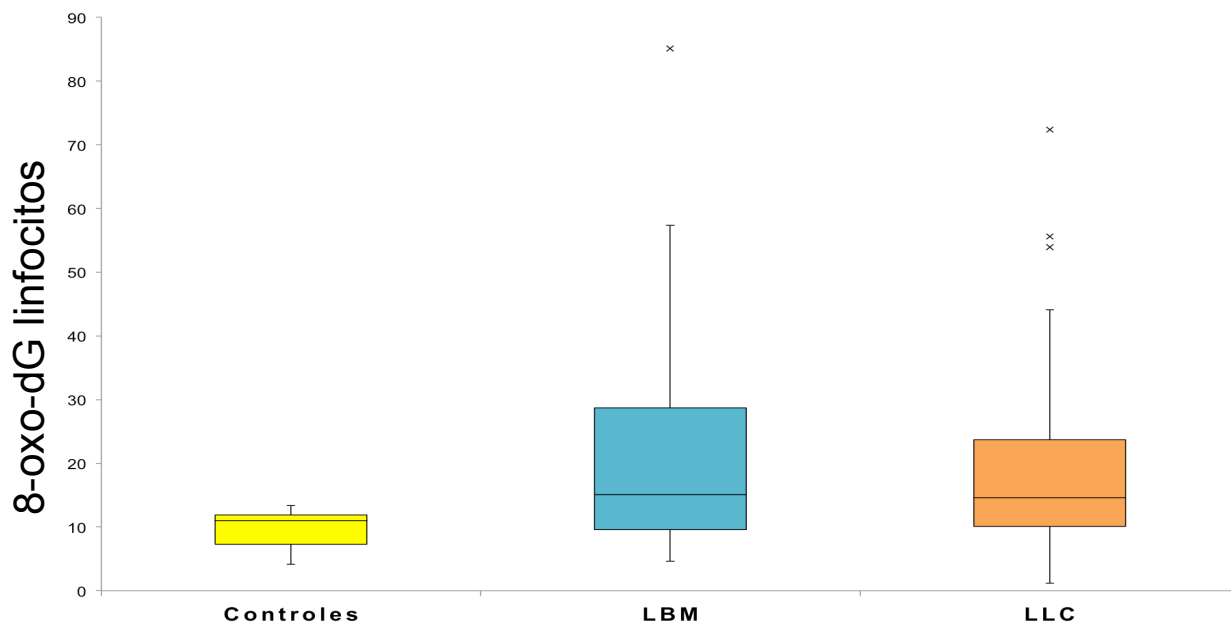
<sup>a</sup> Prueba U de Mann Whitney

<sup>b</sup> Prueba de la Mediana

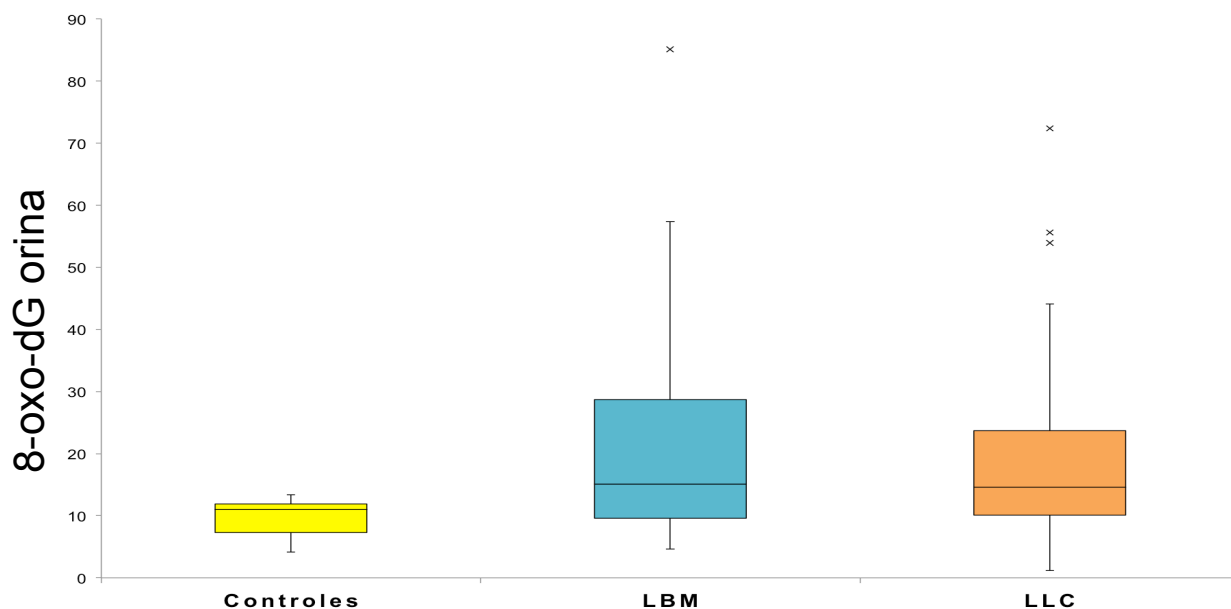
## Resultados y Discusión

**Figura 11.- (A)** Niveles de 8-oxo-dG/10<sup>6</sup> dG en la población mononuclear de pacientes con LBM y LLC frente al grupo control. **(B)** Niveles de 8-oxo-dG en orina (8-oxo-dG/nmol creatinina) de pacientes LBM y LLC frente al grupo control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.

**A**



**B**



Este conjunto de resultados mostró unos niveles altos de oxidación de la guanina llegando incluso a desbordar a los mecanismos de reparación del ADN. Cabe destacar que el aumento de la 8-oxo-dG en el ADN de los linfocitos de la LLC podría deberse a la disminución de la capacidad de reparación que se ha descrito en esta patología (Tuck y cols., 2000).

Cuando los radicales hidroxil están presentes, estos pueden reaccionar tanto con pirimidinas y/o purinas como con las proteínas de la cromatina, provocando modificaciones en las bases nitrogenadas e inestabilidad cromosómica. Estos procesos pueden provocar la aparición de mutaciones genéticas (Ziech y cols., 2011). La inestabilidad genómica es un punto primordial en la carcinogénesis (Panayiotidis, 2008).

La cuantificación de la base 8-oxo-dG excretada en orina representa un producto primario de la reparación del daño oxidativo sobre el ADN *in vivo*. La aparición de esta base oxidada en orina puede ser consecuencia de la actividad de enzimas encargadas de la reparación por escisión de bases (BER). Algunas de las enzimas reparadoras del ADN son específicas de sustrato, como hOGG1 para la base (Faucher y cols., 2012), y la MTH1 cataliza la reducción de los dNTP libres oxidados (Ohtsubo y cols., 2000). Otras enzimas están implicadas en la roturas de la doble cadena de ADN durante la recombinación homóloga como la proteína RAD51 (Thacker, 2005). La reparación de la guanina oxidada es esencial para mantener la homeostasis celular. El papel metastásico que posee esta base modificada se debe a la pérdida de especificidad en el momento del apareamiento de bases, a la pérdida de la pauta de lectura de las pirimidinas contiguas o a la inserción de adeninas en el lugar opuesto de la lesión conocido este proceso como tranversión GC→TA (Floyd, 1990; Shibutani y cols., 1991). Estas tranversiones se han detectado en varios genes supresores de tumores, incluido el gen *TP53* en diferentes tipos de cáncer como en el cáncer de pulmón e hígado (Hollstein y cols., 1996).

En la bibliografía se han descrito niveles aumentados de 8-oxo-dG tanto en orina como en distintos tejidos tumorales, pertenecientes a pacientes con leucemia linfoblástica aguda, cáncer colorectal, displasia cervical de alto grado, carcinoma de células renales, muchos tipos de cáncer de pulmón, cáncer de próstata, metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico (Evans y cols., 2004).

Un estudio reciente analizó la asociación de la LLC con la incidencia de polimorfismos de una sola base (SNPs) en 5 genes implicados en la reparación del ADN (*XRCC1, ERCC2, ERCC4, XRCC3* y *RAD51*) (Ganster y cols., 2009). La frecuencia de los polimorfismos *ERCC2* Lys751Gln, *XRCC1* Arg399Gln, y *ERCC4* Arg415Gln fue superior en pacientes con LLC respecto a los sujetos control, especialmente en los grupos de pacientes con alteraciones citogenéticas asociadas a mal pronóstico como son del(11q) y del(17p). Una proporción de pacientes con LLC adquieren nuevas alteraciones durante la evolución de la enfermedad. La aparición de estos polimorfismos podría relacionarse con

## Resultados y Discusión

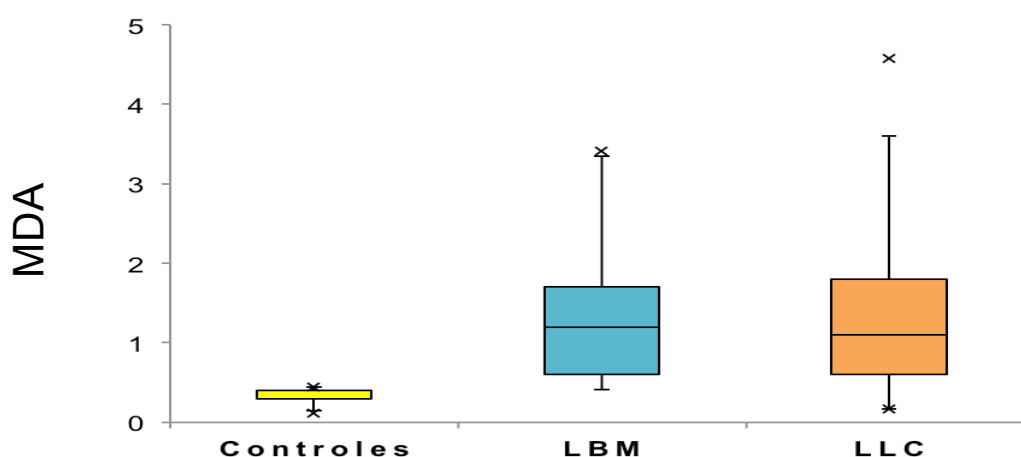
la adquisición de alteraciones citogenéticas que conlleven a un mal pronóstico a lo largo del tiempo (Economopoulou y cols., 2011).

### 3.2.- Peroxidación lipídica: cuantificación de MDA

Existe un aumento significativo ( $p<0.001$ ) del producto de peroxidación lipídica MDA cuando se analizó la población de células mononucleares de los pacientes con LBM (1.2 nmol/mg prot) y se las comparó con la población de los sujetos control (0.4 nmol/mg prot). Los niveles de MDA en los linfocitos de los pacientes con LLC (1.1 nmol/mg prot) también se encontraron significativamente incrementados ( $p<0.001$ ) cuando éstos se comparan con los niveles de MDA de los sujetos control (0.4 nmol/mg prot). Cuando se compararon ambos grupos de pacientes, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de MDA entre ambas patologías ( $p=0.587$ ) (Tabla 13 y figura 12).

Los niveles de MDA, reconocido como biomarcador de peroxidación lipídica se vió incrementado significativamente en ambos grupos de pacientes frente a los sujetos control. Diversos estudios corroboran el aumento de MDA en hemopatologías (Yazdanpanah y cols., 1997; Devi y cols., 2000; Oltra y cols., 2001; Bakan y cols., 2003; Zelen y Djurdjevic, 2009) y otros tipos de neoplasias (Ray y cols., 2000; Yeh y cols., 2005). Aunque por otro lado diversos grupos han documentado un descenso de este bioproducto en otros tipos de cáncer (Gerber y cols., 1996; Alagöl y cols., 1999).

**Figura 12.-** Niveles de MDA (nmol/mg proteína) en la población mononuclear de pacientes con LBM y LLC frente a sujetos control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.



Este daño a nivel de las membranas lipídicas podría explicar la anemia presente en las leucemias y otras neoplasias (Oltra y cols., 2001).



El MDA actúa como promotor tumoral y agente carcinogénico ya que tiene una alta citotoxicidad y una acción inhibitoria frente a las enzimas antioxidantes (Marnett, 1999; Seven y cols., 1999).

### 3.3.- Niveles de 8-isoprostanos (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) en orina

Los isoprostanos son compuestos similares a las prostaglandinas (PGs) que se producen mediante una peroxidación no enzimática del ácido araquidónico inducida por radicales libres (Roberts y Morrow, 1997; Morrow y cols., 1999). Fueron descubiertos por el grupo de Roberts en 1990 (Morrow y cols., 1990).

Los F<sub>2</sub>-isoprostanos son considerados como un biomarcador estándar fiable de estrés oxidativo *in vivo* debido a que no están influidos por la ingesta de lípidos en la dieta y son moléculas químicamente estables y fáciles de detectar. Su cuantificación es representativa de su producción interna. Sus niveles se ven alterados en condiciones fisiopatológicas en las cuales el estrés oxidativo está presente (Morrow y Roberts, 1996; Montuschi y cols., 2010).

En nuestro análisis se cuantificaron los niveles de 8-isoprostanos en orina, pertenecientes a la clase de F<sub>2</sub>-isoprostanos y se observó un aumento en los pacientes de LBM (90.0 ng/mmol creatinina) respecto a los controles (88.2 ng/mmol creatinina) pero no de forma significativa ( $p=0.345$ ) (Tabla 13 y figura 13).

En los pacientes con LLC no se observaron cambios significativos entre los niveles de 8-isoprostanos (72.2 ng/mmol creatinina) y las muestras control (88.2 ng/mmol creatinina) ( $p=0.691$ ). Los valores obtenidos se muestran en la tabla 13 y se representan en la figura 13.

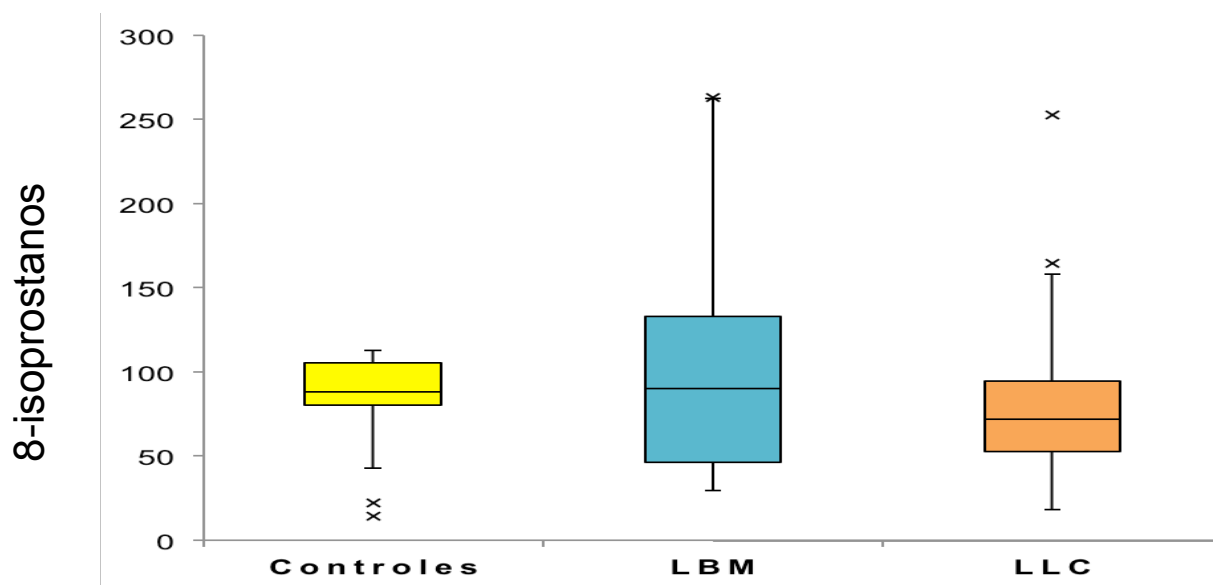
Finalmente, se compararon los niveles de 8-isoprostanos en orina entre ambos grupos de pacientes, no existiendo diferencias en los niveles de este biomarcador ( $p=0.293$ ). Nuestros resultados fueron contrarios a lo esperado ya que los niveles de 8-isoprostanos se han propuesto como marcador de la ineficacia de los sistemas antioxidantes y del estatus oxidativo celular *in vivo* ya que son moléculas estables y se detectan en todos los tejidos humanos y fluidos biológicos (Fam y Morrow, 2003; Milne y cols., 2007).

En 2003 Misaki y colaboradores tampoco encontraron diferencias en los niveles de isoprostanos en plasma en pacientes con leucemia aguda (Misaki y cols., 2003). El grupo de Camphausen en 2004 publicó un descenso de 8-isoprostanos en cáncer de próstata (Camphausen y cols., 2004). Sin embargo, como se comentó anteriormente, en el presente estudio se detectó peroxidación lipídica gracias a los niveles significativamente

## Resultados y Discusión

incrementados de MDA tanto en pacientes con LBM como en los casos con LLC. En cambio, otros grupos han publicado niveles aumentados de isoprostanos en cáncer (Barocas y cols., 2011; Brys y cols., 2013). Esta discrepancia entre ambos biomarcadores puede ser debida a que el MDA es un producto mucho más inespecífico que los 8-isoprostanos.

**Figura 13.-** Niveles de 8-isoprostanos en orina de pacientes con LBM y LLC frente a sujetos control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.



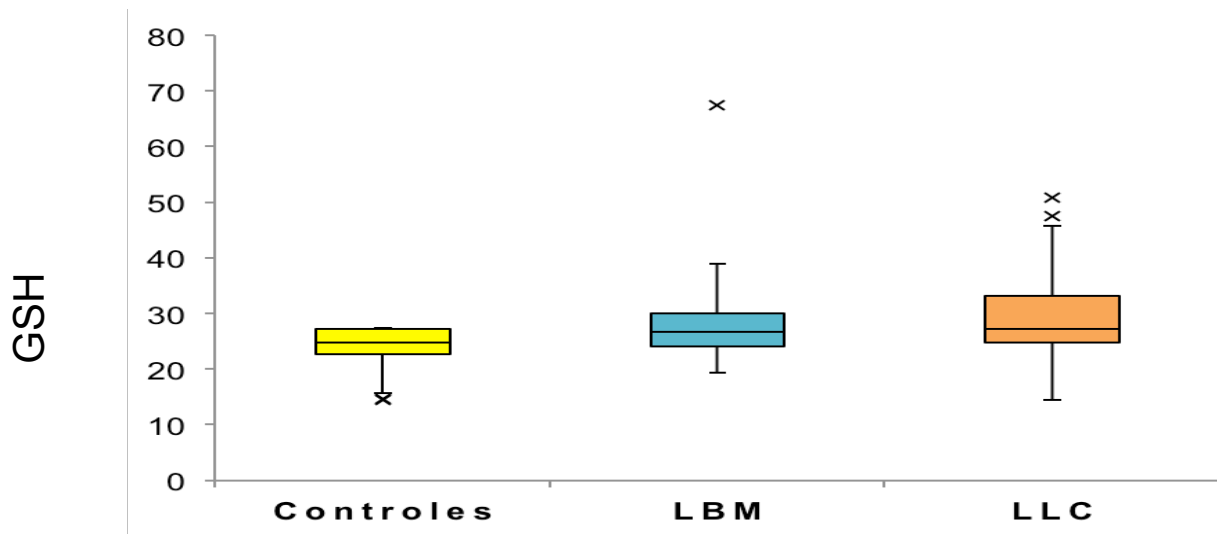
### 3.4.- Niveles de glutatión

Se observaron incrementos significativos en los valores de la forma reducida del glutatión (GSH), la forma oxidada (GSSG) y en el ratio entre ambas en los pacientes con LBM (26.7 nmol/mg prot, 2.8 nmol/mg prot y 10.4 % respectivamente) frente a los sujetos control (24.7 nmol/mg prot, 1.6 nmol/mg prot y 5.8 respectivamente) (el *p-valor* fue <0.001 en las tres comparativas).

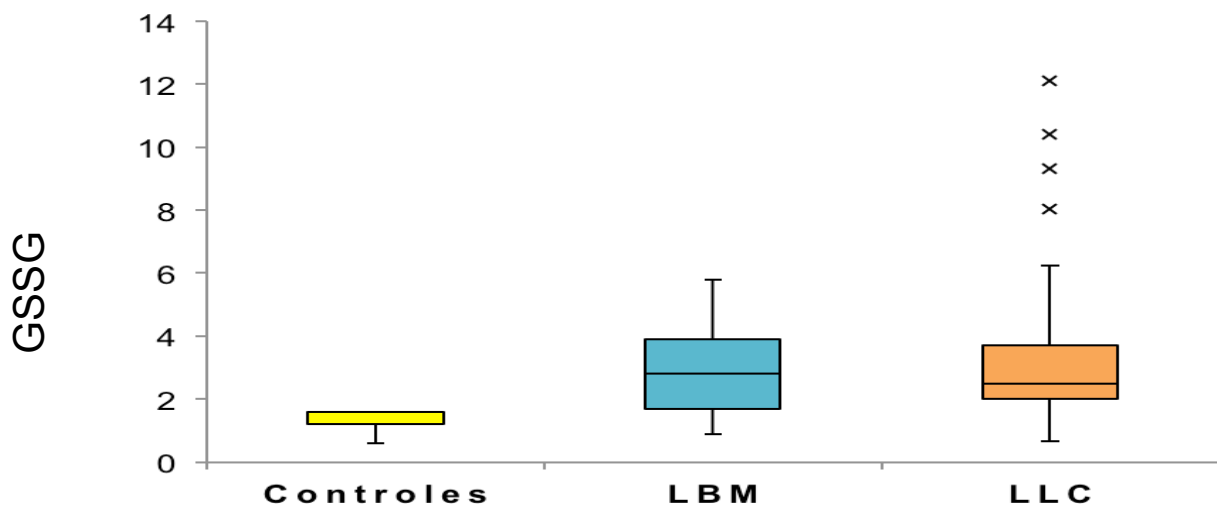
Los valores obtenidos se muestran en la tabla 13 y en las figuras 14, 15 y 16.

En los pacientes con LLC se observó un incremento significativo tanto del glutatión en su forma reducida (GSH) como en su forma oxidada (GSSG) (27.3 nmol/mg prot, 2.5 nmol/mg prot). Así mismo, el ratio entre ambas formas del glutatión, considerado como un marcador fiable de estrés oxidativo, también se vió incrementada de forma significativa (9.2 %) (27.3 nmol/mg prot, 2.5 nmol/mg prot y 9.2 respectivamente) frente a los sujetos control (24.7 nmol/mg prot, 1.6 nmol/mg prot y 5.8 respectivamente) (el *p-valor* fue <0.001 en las tres comparativas) (Tabla 13 y figura 14 y 15).

**Figura 14.-** Niveles de glutatión (GSH) de pacientes con LBM y LLC frente a sujetos control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.



**Figura 15.-** Niveles de glutatión oxidado (GSSG) de pacientes con LBM y LLC frente a sujetos control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.

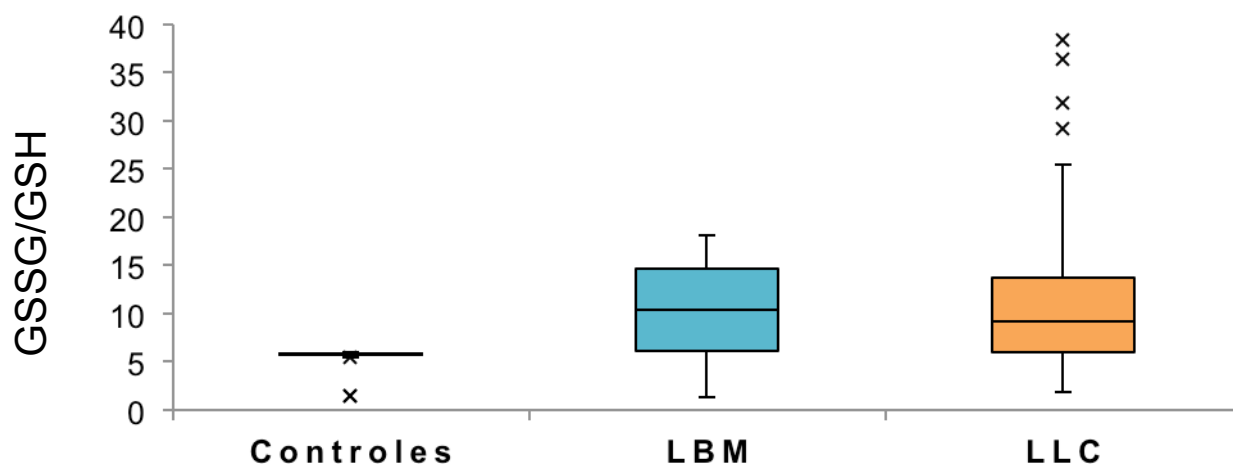


Cuando se compararon los niveles de glutatión obtenidos en LBM y LLC, tanto su forma reducida (GSH) como su forma oxidada (GSSG), no se observaron diferencias significativas. Por consiguiente, la relación GSSG/GSH tampoco mostró diferencias significativas estadísticamente (Tabla 13 y figura 16).

Hoy en día existe un interés creciente en el estudio de los tioles, en particular del glutatión, como indicador del estatus oxidativo celular. Actúa como antioxidante ya que protege a las células del daño de los radicales libres. El ratio GSSG/GSH se emplea para evaluar los niveles de estrés oxidativo celulares, ya que un incremento ha sido descrito en procesos como el envejecimiento, cáncer, replicación del VIH y patologías cardiovasculares (Navarro y cols., 1997; Halliwell y Gutteridge, 2007).

## Resultados y Discusión

**Figura 16.-** Relación GSSG/GSH % de pacientes con LBM y LLC frente a sujetos control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.



Nuestros resultados coincidieron con el incremento de GSH publicado por los grupos de Oltra y Ferraris (Ferraris y cols., 1994; Oltra y cols., 2001). Por el contrario, los grupos de Silber y Bakan observaron un descenso de GSH en los linfocitos de las células de pacientes con LLC. Estas discrepancias pueden deberse a que las cuantificaciones en estos trabajos fueron en suero, y éste tenga un bajo contenido en glutatión (0,5 % del contenido sanguíneo) (Silber y cols., 1992; Bakan y cols., 2003).

El incremento de GSSG que se detectó en nuestros pacientes, tanto de LBM como de LLC puede estar justificado por un aumento descrito en la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en los linfocitos de la LLC (Farber y cols., 1989; Bakan y cols., 2003). La GPx es una de las enzimas más importantes para la detoxificación de peróxidos en las células vivas. Esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y una amplia variedad de peróxidos orgánicos a agua y a alcoholes estables empleando glutatión celular como reactivo reductor.

El aumento de GSH en pacientes con LBM y LLC podría explicarse por cambios en la síntesis de GSH como resultado de la actividad de la enzima GSH sintetasa (GSS). Un estudio previo realizado por Blume y colaboradores, describió un aumento de GSS en pacientes con desórdenes mieloproliferativos (Blume y cols., 1973).

### 3.5.- Determinación actividad enzimática antioxidante de la catalasa

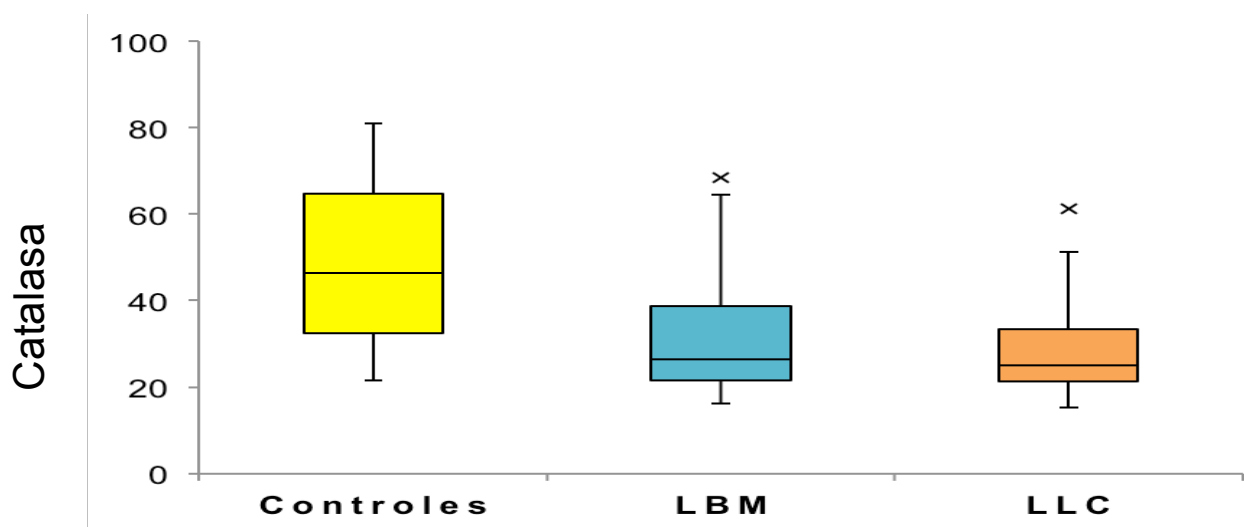
Los organismos aerobios producen una serie de enzimas antioxidantes, como son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, para protegerse frente a los efectos nocivos de los ROS. La enzima catalasa tiene como función la detoxificación del peróxido de hidrógeno presente en las células, siendo central en la respuesta antioxidante celular (Sies y Cadenas, 1985; Halliwell y Gutteridge, 2007).

En nuestro trabajo la actividad de la enzima catalasa disminuyó significativamente en las células mononucleares de los pacientes de LBM (26.4 U/mg prot) respecto a los valores obtenidos en los sujetos control (46.4 U/mg prot) ( $p=0.002$ ). En la tabla 13 quedan reflejados los valores obtenidos y en la figura 17 se representan dichas diferencias.

La actividad de la enzima catalasa en los pacientes con LLC también se encontró disminuida de forma significativa cuando se comparó con la actividad presente en los linfocitos (25.0 U/mg prot) de los sujetos control (46.4 U/mg prot) ( $p<0.001$ ) (tabla 13 y figura 17).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con LBM (26.4 U/mg prot) y LLC (25.0 U/mg prot) ( $p=0.869$ ) (Tabla 13 y figura 17). Estos resultados coinciden con los publicados en 2001 por el grupo de Oltra realizado en linfocitos de LLC (Oltra y cols., 2001). También se ha descrito un descenso de la actividad enzimática en tumores colorectales (Oliva y cols., 1997).

**Figura 17.-** Actividad de la enzima antioxidante catalasa en la población mononuclear de pacientes con LBM y LLC frente a sujetos control. Se muestra la mediana; percentiles 25 y 75.



Un descenso de la actividad en la enzima catalasa conlleva a una acumulación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en células tumorales (Iwata y cols., 1984; Kono y Fridovich, 1982; Sun, 1990).

Además, la enzima catalasa parecía inhibir las alteraciones cromosómicas causadas por la hipoxantina/xantina oxidasa en células de hámster. En nuestro trabajo al verse reducida quizá no pueda jugar ese papel protector, ayudando de alguna manera a la aparición de las alteraciones citogenéticas descritas en la LBM y LLC.

## **Resultados y Discusión**

Este conjunto de resultados nos lleva a pensar que el descenso de actividad de la enzima catalasa provoca una acumulación de radicales oxigénicos, que a su vez incrementan el daño oxidativo que padecen las células de la LBM y LLC.

### **4.- Correlación del metabolismo oxidativo y parámetros clínico biológicos**

#### **4.1.- Estrés oxidativo y morfología linfocitaria en la LLC**

Se estudiaron los diferentes parámetros marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con LLC con morfología típica frente a los que presentaban una morfología atípica.

No existieron diferencias significativas respecto a los niveles de 8-oxo-dG, MDA, 8-isoprostanos, GSH, GSSG, en la relación GSSG/GSH ni en la actividad de la enzima catalasa entre los pacientes con LLC típica frente morfología atípica (Tabla 14).

Este hecho puede deberse a que las diferencias morfológicas en los linfocitos B de la LLC no se traducen en diferencias metabólicas, compartiendo los mismos mecanismos de daño oxidativo.

#### **4.2.- Estrés oxidativo y expresión de CD38 y ZAP70 en la LLC**

CD38 es una ectoenzima con una expresión muy amplia, implicada en varias funciones, haciendo muy complicado asignarle una función en particular que afecte de manera directa en la patogénesis de la LLC (Brachtl y cols., 2014).

Se consideró como CD38 positivo cuando la expresión era igual o superior al 30% de los linfocitos de la LLC coincidiendo con el grupo de Del Poeta y Hamblin (Del Poeta y cols., 2001; Hamblin y cols., 2002). Es importante mencionar que existe una gran controversia acerca de cual es el punto de corte correcto para este parámetro. En la bibliografía se han descrito puntos de corte del 30%, 20%, 7% e incluso inferiores (Damle y cols., 1999; Ghia y cols., 2003; Ibrahim y cols., 2001; Kröber y cols., 2002). Harían falta más estudios con el propósito de establecer un punto de corte consensuado (Montserrat, 2006; Vroblová y cols., 2009).

Se han descrito variaciones en la expresión de la molécula a lo largo del curso de la LLC, los valores pueden aumentar aunque generalmente los pacientes con ausencia de expresión al inicio de la enfermedad generalmente nunca la expresan (Ghia y cols, 2004; Ghia y cols., 2003; Hamblin y cols., 2002; Patten y cols., 2008). Parece ser que la

molécula puede adquirirse o perderse en las células de la LLC según su activación o estatus proliferativo (Patten y cols., 2008).

**Tabla 14.-** Marcadores de estrés oxidativo comparando morfología típica y atípica en la LLC.

	LLC típica n=44 Mediana (Q1-Q3)	LLC atípica n=11 Mediana (Q1-Q3)	p-valor <sup>a</sup>
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	50.31 (35.64-57.54)	46.67 (33.55-77.84)	p=0.400
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	14.62 (9.97-23.66)	18.06 (10.23-23.90)	p=0.710
<b>8-isoprostanos</b> (ng/mmol creatinina)	71.58 (50.71-94.74)	89.78 (62.42-110.54)	p=0.378
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	1.14 (0.71-1.72)	0.85 (0.51-2.22)	p=0.809
<b>GSH</b> (nmol/mg prot)	26.90 (24.74-32.20)	30.78 (25.40-34.22)	p=0.443
<b>GSSG</b> (nmol/mg prot)	2.46 (1.95-3.93)	2.64 (2.05-3.59)	p=0.614
<b>GSSG/GSH %</b>	8.62 (5.90-14.30)	9.33 (7.67-11.32)	p=0.669
<b>Catalasa</b> (U/mg prot)	25.04 (21.76-33.01)	24.77 (18.92-37.66)	p=0.917

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75  
<sup>a</sup> Prueba de la Mediana

El análisis de expresión de CD38 en la superficie de las células de la LLC está considerado como factor pronóstico en esta patología. Diferentes estudios demuestran que su expresión está asociada a progresión de la enfermedad en menor tiempo y a periodos de supervivencia inferiores (Chevallier y cols., 2002).

En la actualidad el estudio de expresión de CD38 y ZAP70 en los linfocitos leucémicos de la LLC ha adquirido gran importancia debido a su valor pronóstico. Partiendo pues de su importancia, se estudiaron las posibles diferencias en el metabolismo oxidativo según la expresión de CD38 y ZAP70 en nuestros pacientes. Como punto de corte para establecer si se consideraba positiva o negativa su expresión, se consideró que para ser CD38 positivo la expresión debía ser  $\geq 30\%$  y para ZAP70 la expresión de la molécula debía ser  $\geq 20\%$ .

## Resultados y Discusión

Se observó un descenso de la actividad de la enzima catalasa en el grupo de pacientes CD38 positivo en comparación con el grupo sin expresión de CD38 con tendencia a la significación (Tabla 15) y un aumento significativo de los niveles de MDA del grupo de ZAP70 negativo (1.71 nmol/mg prot) frente al grupo de ZAP70 positivo (0.93 nmol/mg prot) ( $p=0.027$ ).

**Tabla 15.-** Marcadores de estrés oxidativo en función de la expresión de CD38 en LLC.

	CD38 negativo n=33 Mediana (Q1-Q3)	CD38 positivo n=12 Mediana (Q1-Q3)	<i>p</i> -valor <sup>a</sup>
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	48.10 (29.67-61.82)	44.91 (37.09-57.54)	$p=0.474$
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	13.81 (8.86-24.13)	17.79 (10.48-19.13)	$p=0.612$
<b>8-isoprostanos</b> (ng/mmol creatinina)	71.35 (49.68-88.30)	89.89 (52.55-116.13)	$p=0.322$
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	1.29 (0.71-2.02)	1.02 (0.56-1.38)	$p=0.108$
<b>GSH</b> (nmol/mg prot)	28.73 (24.69-32.54)	27.26 (24.78-33.44)	$p=0.640$
<b>GSSG</b> (nmol/mg prot)	2.55 (1.73-3.77)	2.28 (2.02-3.27)	$p=0.926$
<b>GSSG/GSH %</b>	8.93 (5.30-13.12)	9.20 (7.51-14.39)	$p=0.602$
<b>Catalasa</b> (U/mg prot)	28.08 (22.89-35.35)	23.51 (18.13-24.94)	$p=0.051$

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75

<sup>a</sup> Prueba de la Mediana

Se consideró CD38 positivo > 30%

No existieron diferencias significativas respecto a los niveles de 8-oxo-dG, 8-isoprostanos, GSH, GSSG ni la relación GSSG/GSH en el estudio de CD38 ni en el de ZAP70 (Tabla 15 y tabla 16). Por último se estudió la actividad de la enzima catalasa entre los grupos de ZAP70 y no se obtuvieron diferencias significativas.

Llegados a este punto del análisis se podría pensar que el daño a nivel oxidativo está presente en los linfocitos de la LLC, y que la expresión o no de ZAP70 y/o CD38 no interfiere en el metabolismo oxidativo de estas células neoplásicas.



**Tabla 16.-** Marcadores de estrés oxidativo en función de la expresión de ZAP-70 en LLC.

	ZAP-70 negativo n=15 Mediana (Q1-Q3)	ZAP-70 positivo n=22 Mediana (Q1-Q3)	<i>p</i> -valor <sup>a</sup>
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	40.72 (26.47-61.88)	43.54 (36.81-52.65)	<i>p</i> =0.610
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	12.84 (6.62-23.66)	15.75 (12.56-23.42)	<i>p</i> =0.433
<b>8-isoprostanos</b> (ng/mmol creatinina)	67.80 (44.28-76.92)	88.14 (52.55-116.13)	<i>p</i> =0.619
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	1.71 (1.10-2.24)	0.93 (0.60-1.24)	<b><i>p</i>=0.027</b>
<b>GSH</b> (nmol/mg prot)	30.62 (24.52-32.20)	26.62 (24.78-33.44)	<i>p</i> =0.665
<b>GSSG</b> (nmol/mg prot)	2.46 (1.70-3.72)	2.46 (2.02-4.29)	<i>p</i> =0.267
<b>GSSG/GSH %</b>	8.16 (5.37-11.55)	9.24 (7.51-14.39)	<i>p</i> =0.066
<b>Catalasa</b> (U/mg prot)	24.70 (22.91-33.33)	24.60 (19.44-33.38)	<i>p</i> =0.611

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75  
<sup>a</sup> Prueba de la Mediana  
 Se consideró ZAP-70 positivo > 20%

Los niveles elevados de expresión de ZAP70 son más altos en las células T y NK, teniendo una expresión nula o normal en las células B. Este hecho hace que sea fácil identificar las células de la LLC (Crespo y cols., 2003).

La expresión de ZAP70 se considera un buen biomarcador ya que permanece estable a lo largo del curso de la enfermedad aunque se han descrito una conversión a negativo en pacientes de curso estable, y un cambio a positivo en pacientes con el gen de la *IgHV* no mutado a la vez que progresaban o recaían en su enfermedad (Vroblová y cols., 2009). La expresión de ZAP70 tiene valor pronóstico por si misma (Crespo y cols., 2003; Orchard y cols., 2004; Rassenti y cols., 2004; Wiestner, 2005; Bosch y cols., 2006; Del Principe y cols., 2006).

ZAP70 es una tirosina quinasa descrita inicialmente en el complejo de transducción del receptor de células T. Se piensa que aumenta la sensibilidad del receptor de células B en la células de la LLC, en la estimulación antigénica (Chen y cols., 2005).

## Resultados y Discusión

No pudimos recoger los datos de CD38 ni ZAP70 de los pacientes clasificados con LBM, aunque Rawstron y colaboradores en el 2002 publicaron una ausencia de expresión de dicha molécula en los linfocitos, sugiriendo un estadio temprano de una variedad de LLC indolente. La expresión de CD38 no ayuda a predecir el riesgo de progresión de LBM a LLC, ya que incluso los pacientes que requieren tratamiento en algún momento del curso de su enfermedad presentaban en su inicio unos niveles bajos de expresión (Rawstron y cols, 2002).

### 4.3.- Estudio del metabolismo oxidativo según el estadio de Binet

En esta parte del estudio se trató de analizar las diferencias en el metabolismo oxidativo por estadios clínicos en la LLC según Binet. Estos estadios ayudan a clasificar a los pacientes según su pronóstico teniendo los del grupo A mejor pronóstico que los del grupo B, y éstos a su vez mejor pronóstico que los del C (Cheson y cols., 1996).

Se estudiaron un total de 55 pacientes con LLC, 49 pertenecían al estadio A de Binet, 5 pertenecían al estadio B y un único paciente pertenecía al estadio C.

Cuando se compararon los niveles de los distintos parámetros del metabolismo oxidativo frente a los grupos según el estadio de Binet (A vs B+C) se vieron diferencias significativas respecto a la peroxidación lipídica. Los niveles de MDA fueron inferiores entre los pacientes en estadio A (1.08 nmol/mg prot) frente a los pacientes en estadio B y C (1.95 nmol/mg prot) ( $p=0.040$ ) (Tabla 17). Los pacientes con mayor daño lipídico son aquellos en estadio de Binet B+C, en los cuales la enfermedad está más avanzada, en consonancia con los resultados publicados sobre el aumento de este biomarcador en la LLC.

En lo relacionado con los niveles de 8-isoprostanos en los grupos de pacientes con LBM y LLC frente a los sujetos control no se hallaron diferencias significativas. Sin embargo, si se comparan los grupos de pacientes con la enfermedad no activa (estadio A) (71.36 ng/mmol creatinina) frente a los pacientes con la enfermedad activa (estadio B+C) (116.13 ng/mmol creatinina) si existen diferencias significativas ( $p=0.036$ ) (Tabla 17). Estos resultados nos hacen pensar si quizá los niveles de 8-isoprostanos son un indicador de la progresión de la enfermedad. Otros estudios serán necesarios en un futuro para corroborar estos resultados (Morrow y cols., 1999; Montuschi y cols., 2010; Barocas y cols., 2011; Brys y cols., 2013).

**Tabla 17.-** Marcadores de estrés oxidativo en función del estadio de Binet de los pacientes con LLC.

	<b>A</b> n=49 Mediana (Q1-Q3)	<b>B+C</b> n=6 Mediana (Q1-Q3)	<i>p</i> -valor <sup>a</sup>
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	47.61 (34.20-58.82)	48.42 (39.33-57.23)	<i>p</i> =0.969
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	16.37 (10.70-23.76)	10.48 (9.14-21.91)	<i>p</i> =0.341
<b>8-isoprostanos</b> (ng/mmol creatinina)	71.35 (50.53-90.86)	116.13 (83.80-121.32)	<b><i>p</i>=0.036</b>
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	1.08 (0.66-1.49)	1.95 (1.20-3.59)	<b><i>p</i>=0.040</b>
<b>GSH</b> (nmol/mg prot)	28.20 (24.69-32.50)	27.26 (25.17-35.53)	<i>p</i> =0.207
<b>GSSG</b> (nmol/mg prot)	2.46 (2.02-3.77)	2.99 (1.45-5.65)	<i>p</i> =0.774
<b>GSSG/GSH %</b>	8.91 (6.84-13.92)	9.46 (4.78-21.39)	<i>p</i> =0.467
<b>Catalasa</b> (U/mg prot)	24.82 (21.19-31.76)	36.85 (21.37-49.34)	<i>p</i> =0.223

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75

<sup>a</sup> Prueba de la Mediana

No se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de 8-oxo-dG, de GSH, GSSG, en la relación GSSG/GSH ni en la cuantificación de la enzima catalasa entre los pacientes en estadio A al compararlos con los pacientes en estadio B+C.

## 5.- Metabolismo oxidativo en relación con la evolución temporal de los pacientes con LLC

Los pacientes con LLC se distribuyeron en tres grupos dependiendo del tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el momento del estudio, analizándose las posibles diferencias respecto a los parámetros de estrés oxidativo. Los grupos establecidos fueron: de 1-24 meses, de 25-60 meses y  $\geq 61$  meses y los resultados quedan reflejados en la tabla 18.

## Resultados y Discusión

Con respecto a la cantidad de MDA, se observó un descenso significativo del grupo 2 al grupo 3 (1.95 nmol/mg prot vs 1.06 nmol/mg prot,  $p=0.025$ ), pudiendo deberse a que los pacientes diagnosticados hacía más de 5 años en el momento del estudio se encontraban en una fase de la enfermedad estable.

La enzima antioxidante catalasa presenta un aumento significativo cuando se comparan los pacientes del grupo 1 con los del grupo 2 (22.91 U/mg prot vs 28.55 U/mg prot,  $p=0.011$ ) respaldando la idea de que la enfermedad se estabiliza con el tiempo.

No se observaron diferencias significativas en los valores de 8-oxo-dG presente en las células mononucleares de los pacientes con LLC, ni en los niveles de 8-oxo-dG excretada en orina. Así como tampoco en los niveles de 8-isoprostanos, GSSG, GSH ni en la relación GGSG/GSH.

Nuestros resultados no coinciden con los que encontramos en la bibliografía (Oltra y cols., 2001). Quizá esto se deba a que la agrupación de los pacientes es distinta. También podría ser causado por el hecho de que en los pacientes de LLC si no progresa su enfermedad puede permanecer estable a lo largo del tiempo, por lo que su metabolismo oxidativo no sufriría cambios.

## 6.- Metabolismo oxidativo en los subgrupos citogenéticos de la LLC

Finalmente, en esta parte del trabajo se analizó la posible asociación entre los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo y los subgrupos citogenéticos en la LLC establecidos mediante FISH.

Se estudiaron un total de 55 pacientes diagnosticados de LLC sin tratamiento previo y se les realizó un estudio FISH en interfase. Los resultados obtenidos se comentaron previamente en el apartado 2.3.

La LLC es una patología que presenta un curso variable, en parte explicado por el proceso de evolución clonal. Además, las alteraciones en los sistemas antioxidantes y estrés oxidativo influyen en las cascadas genéticas y epigenéticas provocando alteraciones en la expresión génica en los procesos carcinogénicos humanos (Ziech y cols., 2011).

A pesar de los datos disponibles sobre el estatus oxidativo en la LLC, se desconoce el efecto que puede tener el estrés oxidativo en la heterogeneidad citogenética. Por ello, resultó de interés la comparación de los diferentes parámetros oxidativos entre los diferentes subgrupos citogenéticos establecidos mediante FISH (pacientes con delección 13q14, 11q22, 17p13, trisomía 12 y FISH normal).

**Tabla 18.-** Marcadores de estrés oxidativo y grupos temporales en pacientes con LLC.

	Grupo 1 1-2 años n=22 Mediana (Q1-Q3)	Grupo 2 3-5 años n=18 Mediana (Q1-Q3)	Grupo 3 > 5 años n=15 Mediana (Q1-Q3)	p-valor <sup>a</sup>		
				(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(2) vs. (3)
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	42.31 (29.08-48.42)	57.80 (38.18-63.27)	52.76 (37.09-55.78)	p=0.545	p=0.383	p=0.986
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	13.38 (10.15-19.13)	12.84 (8.56-26.27)	18.23 (14.24-41.89)	p=0.746	p=0.401	p=0.464
<b>8-isoprostanos</b> (ng/mmol creatinina)	71.64 (52.55-116.13)	76.19 (54.79-104.52)	71.58 (50.71-86.15)	p=0.932	p=0.247	p=0.259
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	0.93 (0.56-1.38)	1.95 (0.87-2.47)	1.06 (0.74-1.34)	p=0.174	p=0.778	<b>p=0.025</b>
<b>GSSG</b> (nmol/mg prot)	2.46 (1.7-5.41)	3.46 (1.94-3.83)	2.23 (2.02-2.73)	p=0.568	p=0.778	p=0.267
<b>GSH</b> (nmol/mg prot)	29.28 (25.24-33.82)	30.62 (24.76-32.82)	26.76 (24.52-31.84)	p=0.922	p=0.359	p=0.377
<b>GSSG/GSH %</b>	9.24 (5.90-15.57)	9.20 (6.52-11.90)	8.33 (6.04-14.30)	p=0.549	p=0.606	p=0.896
<b>Catalasa</b> (U/mg prot)	22.91 (18.13-30.70)	28.55 (24.52-38.33)	25.89 (21.76-33.01)	<b>p=0.011</b>	p=0.217	p=0.331

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; LBM: linfocitosis B monoclonal; LLC: leucemia linfática crónica; Q1: percentil 25; Q3: percentil 75

<sup>a</sup> Prueba U de Mann Whitney

## Resultados y Discusión

Entre los cinco subgrupos citogenéticos, se observaron diferencias significativas globales respecto a los niveles de 8-oxo-dG, las cuales se debieron a los incrementos de la base modificada en aquellos pacientes con delección de *TP53* y FISH normal (tabla 19 y figura 18).

Como se muestra en la figura 18, existe un aumento significativo de 8-oxo-dG en el grupo de FISH normal respecto a los pacientes con delección 13q ( $57.17 \pm 18.45$  versus  $39.40 \pm 15.69$  8-oxo-dG/ $10^6$ ,  $p=0.004$ ). Análogamente, observamos una tendencia a la significación ( $p=0.071$ ) entre los grupos con delección 17p y delección 13q, quizá debido al bajo número de pacientes con delección de *TP53*.

El gen *TP53* está implicado en la detención del crecimiento, reparación del ADN, apoptosis, y rutas de senescencia. Recientemente el grupo de Sablina ha propuesto una nueva función para la proteína p53 (Sablina y cols., 2005). Sugieren que su función protectora se extiende incluso a la defensa antioxidante. Genes como *SOD2*, *GPX1*, *ALDH4A*, *HI95* y *PA26* codifican productos que actúan como antioxidantes y que a su vez están modulados por *TP53*. Además, la desregulación de *TP53* eleva los niveles de ROS intracelulares, aumentando así la tasa de mutación y la inestabilidad del cariotipo. En el mismo sentido, Macedo y colaboradores han descrito un aumento en el daño oxidativo en los portadores en línea germinal de la mutación de *TP53* p.R337H en familias con síndromes de Li-Fraumeni (Macedo y cols., 2012).

Los resultados están en consonancia con estas publicaciones ya que el grupo de pacientes con delección del gen *TP53*, y como consecuencia una alteración de la proteína p53, muestran un aumento de 8-oxo-dG en sus linfocitos. Por lo tanto, el mal pronóstico de este grupo de pacientes podría explicarse por las altas concentraciones de la base oxidada, además de la implicación de las alteraciones de *TP53* en los cariotipos complejos (Collado y cols., 2006; Delgado y cols., 2012). Por otro lado, el grupo con FISH normal presenta mayores niveles de daño oxidativo en el ADN de lo esperado, pudiendo contribuir a la aparición de alteraciones cromosómicas asociadas a mal pronóstico como se ha descrito recientemente en un tercio de los pacientes con LLC y FISH normal (Rigolin y cols., 2012). De hecho, es importante mencionar que dos de los casos eran portadores de alteraciones citogenéticas que no estaban incluidas en el panel de sondas FISH empleado. Un paciente era portador de una delección del(12)(p12), y el otro de una translocación t(2;7)(p21;q32).

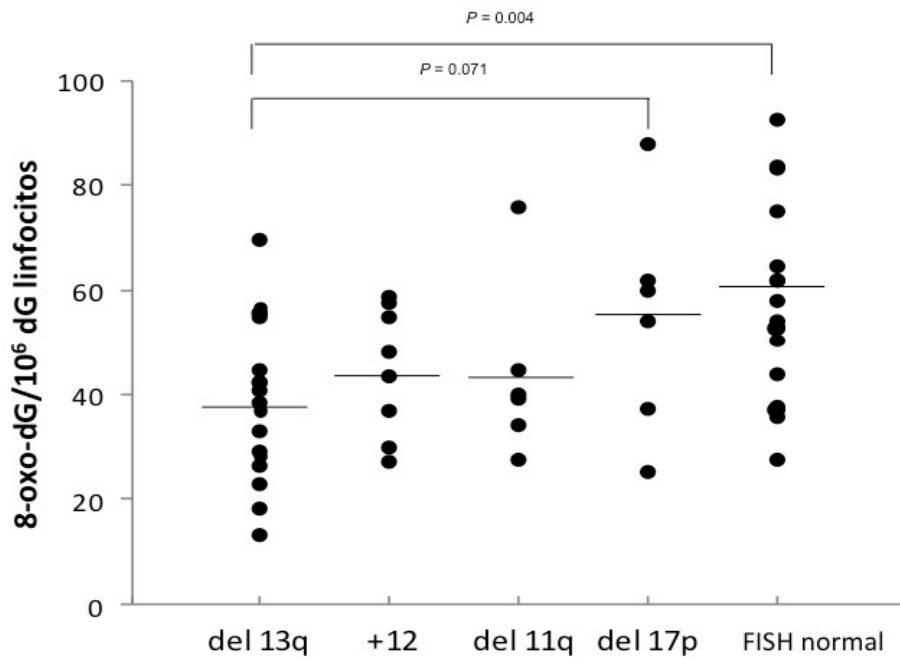
**Tabla 19.-** Marcadores de estrés oxidativo y subgrupos citogenéticos en pacientes con LLC.

	del(13q14) n=18 Media ± DS	Trisomía 12 n=8 Media ± DS	del(11q22) n=6 Media ± DS	del(17p13) n=6 Media ± DS	FISH Normal n=17 Media ± DS	<i>p</i> -valor <sup>a</sup>
<b>8-oxo-dG linfocitos</b> (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	39.40 ± 15.69	44.65 ± 12.26	43.58 ± 16.82	54.46 ± 21.66	57.17 ± 18.45	<b><i>p</i>=0.034</b>
<b>8-oxo-dG orina</b> (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina)	19.70 ± 15.32	22.87 ± 15.13	27.31 ± 15.03	12.22 ± 4.50	18.76 ± 11.60	<i>p</i> =0.676
<b>Glutación</b> (nmol/mg prot)	28.28 ± 5.08	26.15 ± 5.75	35.48 ± 9.00	26.72 ± 6.35	28.30 ± 8.09	<i>p</i> =0.118
<b>MDA</b> (nmol/mg prot)	1.14 ± 0.61	1.04 ± 0.74	2.09 ± 1.73	2.08 ± 0.78	1.48 ± 0.78	<b><i>p</i>=0.050</b>

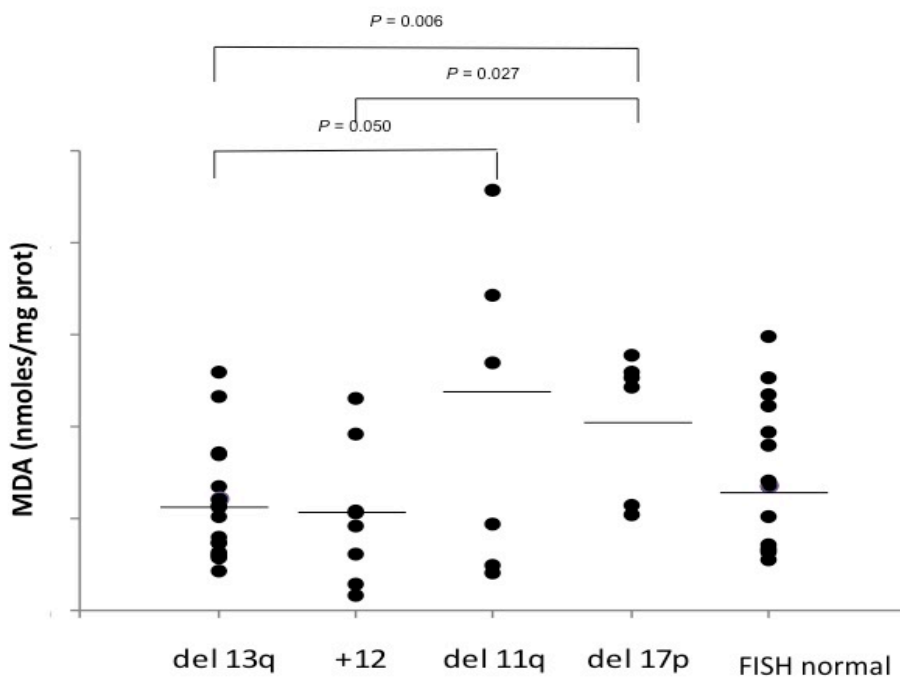
8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxoguanosina; MDA: malondialdehido; DS: desviación estándar LLC: leucemia linfática crónica;  
<sup>a</sup> Análisis de la varianza (ANOVA)

## Resultados y Discusión

**Figura 18.- (A)** Análisis de los niveles de 8-oxo-dG/10<sup>6</sup> dG en la población mononuclear de los diferentes grupos citogenéticos. **(B)** Análisis de los niveles de MDA (nmoles/mg prot.) en la población mononuclear de los diferentes grupos citogenéticos. Se muestra la media  $\pm$  desviación típica.



**A**



**B**



Se requiere de un mayor número de estudios para analizar las posibles alteraciones genéticas dentro del grupo de FISH normal. Además, la aparición de nuevas mutaciones que confieren un pronóstico desfavorable como son *NOTCH1*, *SF3B1* y *BIRC3* es un tema importante a tener en cuenta en estudios futuros en este grupo.

Las bases oxidadas en el ADN son eliminadas del mismo mediante sistemas de reparación de escisión de bases/nucleóticos (BER) (Tudek y cols., 2010). Como consecuencia, la base oxidada se puede cuantificar en orina, siendo un parámetro fiable de la reparación del ADN *in vivo*. En el grupo de pacientes estudiado no se encontraron diferencias significativas respecto a los niveles de 8-oxo-dG excretada en orina. Aún así, se observó un descenso de los niveles en el grupo portador de la delección 17p, pudiendo sugerir un descenso de la eficiencia del sistema de reparación del ADN quizá debida a una alteración en la expresión del gen *OGG1* (Tudek y cols., 2010).

Como ya se ha descrito en el apartado 3.3 de la introducción, el glutatión es un tiol con función antioxidante que se encuentra elevado en las células de los pacientes de LLC. Cuando se compararon los niveles de glutatión no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos citogenéticos.

Para concluir nuestro estudio, se compararon los niveles de MDA, entre los diferentes grupos citogenéticos. El MDA es un importante biomarcador de estrés oxidativo, informando del daño a nivel de membranas lipídicas (peroxidación lipídica). Hemos observado una asociación entre el contenido de MDA del plasma y los grupos citogenéticos de mal pronóstico. Los pacientes con delección de *TP53* y *ATM* poseen mayores niveles de MDA cuando se les compara con los grupos con del13q y trisomía 12 (Figura 18). Estos resultados se confirman con los hallados por Macedo y colaboradores en los portadores de la mutación p.R337H en *TP53* (Macedo y cols., 2012). Recientemente se ha publicado que el gen *ATM* podría tener un papel en la regulación del balance redox celular, regulando la fisiología mitocondrial (Shiloh y Ziv, 2013). La células con deficiencia en el gen *ATM* se han asociado a disfunciones mitocondriales. Por lo tanto, la peroxidación lipídica observada en los pacientes con LLC portadores de la delección del gen *ATM* podría alterar el potencial de membrana mitocondrial afectando así a su actividad normal.

Finalmente, el conjunto de resultados del presente estudio podría ser la base de un nuevo horizonte terapéutico de aplicación en la LLC. El uso combinado de terapias antioxidantes junto a las terapias que se aplican hoy en día podría contribuir a una mejora de la supervivencia de los pacientes con LLC. En este sentido, Jitschin y colaboradores han tratado con el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) células de LLC. El estrés oxidativo

## **Resultados y Discusión**

disminuye la respuesta inmune provocando disfunciones e incluso llevando a la apoptosis a las células NK y T sugiriendo una vía de escape del tumor del sistema inmune. La adición de NAC previene la disfunción de las células de la LLC mediada por las células T. Los autores concluyen que el tratamiento de las células de la LLC empleando antioxidantes podría neutralizar los ROS endógenos y proteger el sistema inmune. Estas estrategias han sido aplicadas con éxito en otras entidades hematológicas como la leucemia mieloide crónica (Brune y cols., 2006; Jitschin y cols., 2014).

# **Conclusiones**



## V.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados de este trabajo de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. En la LBM y en la LLC se observa un incremento significativo del daño oxidativo y un descenso de la actividad enzimática antioxidante en comparación con la población normal, viéndose afectado tanto al ADN como las estructuras lipídicas.
2. No existen diferencias en el estatus oxidativo entre los linfocitos de la LBM y la LLC, indicando que el desequilibrio oxidativo como tal se establece en una fase temprana en la evolución de dichas patologías.
3. Los pacientes con LBM presentan al igual que los casos con LLC alteraciones citogenéticas, sin embargo, la incidencia de anomalías de mal pronóstico (deleciones de *TP53* y *ATM*) es inferior.
4. Entre los pacientes con LLC portadores de alteraciones citogenéticas de mal pronóstico (deleciones de *TP53* y *ATM*) se observa una mayor acumulación de la base modificada 8-oxo-dG y/o del metabolito indicador de peroxidación lipídica MDA frente a los casos con deleción de 13q14 o trisomía 12, lo cual puede contribuir en parte a la progresión de la enfermedad.
5. El incremento significativo de 8-oxo-dG observado entre los casos con FISH normal sugiere que este grupo de pacientes no es tan indolente como se pensaba. Futuros estudios serán necesarios para dilucidar cómo el daño oxidativo a nivel de ADN puede dar lugar a la aparición de otras alteraciones genéticas de significado pronóstico.



**ANEXOS**





# **Anexo 1: Publicaciones**





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Cancer Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet)

## Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis

Rosa Collado <sup>a,\*</sup>, Isabel Oliver <sup>b,1</sup>, Carmen Tormos <sup>c</sup>, Mercedes Egea <sup>a</sup>, Amparo Miguel <sup>a</sup>, Concha Cerdá <sup>c,d</sup>, David Ivars <sup>b</sup>, Silvia Borrego <sup>d</sup>, Felix Carbonell <sup>a,b</sup>, Guillermo T. Sáez <sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Service of Hematology, CDB-University General Hospital of Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain

<sup>d</sup> Service of Clinical Analyses, CDB-University General Hospital of Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 July 2011

Received in revised form 12 November 2011

Accepted 14 November 2011

#### Keywords:

Monoclonal B Lymphocytosis  
Chronic lymphocytic leukaemia  
Oxidative stress  
8-Oxo-dG  
Antioxidants  
DNA damage  
F<sub>2</sub>-isoprostanes

### ABSTRACT

Monoclonal B Lymphocytosis (MBL) is defined as asymptomatic monoclonal B-cell expansion characterised by a CLL-phenotype, but with less than  $5 \times 10^9/l$  circulating cells. Reactive oxygen species (ROS)-mediated cell damage plays a critical role in the initiation of carcinogenesis as well as in malignant transformation. The goal of this study was to perform an analysis of the oxidative stress statuses of patients affected by MBL and chronic lymphocytic leukaemia (CLL). We examined peripheral blood and urine specimens from 29 patients with MBL, 55 with CLL and 31 healthy subjects. There was a significant increase in the occurrence of the mutagenic base 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) in the lymphocytes and urine of MBL and CLL patients compared with controls. Significant differences were also observed in the levels of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) and in the oxidised/reduced glutathione (GSSG/GSH) ratio, although an increase in 8-isoprostane was not detected. Interestingly, the antioxidant catalase activity of circulating lymphocytes decreased in the patient groups. In conclusion, early oxidative stress exists in patients with MBL and CLL, causing damage to DNA and lipid structures. The higher levels of 8-oxo-dG in lymphocytes than in urine may be related to a decrease in the capacity of DNA repair systems. There were no differences in the oxidative statuses of the MBL and CLL patients, suggesting that oxidative injuries appear during a pre-leukaemic state of the disease.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Monoclonal B-cell Lymphocytosis (MBL) was recently recognised as a novel clinical manifestation by the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) (2008). MBL is defined as the presence of fewer than  $5 \times 10^9$  B lymphocytes/litre of blood in the absence of lymphadenopathy, organomegaly, cytopenias, or B symptoms [1]. The incidence of MBL is age-related and increases to 5% or more in patients over the age of 60 years. Nevertheless, these patients progress to clinically significant CLL at a rate of 1–2% per year [2]. MBL is a novel, pre-malignant condition characterised by the continuous production of CLL-like cells in a significant proportion of healthy adults [3,4]. MBL shares the biological features

\* Corresponding authors. Addresses: Service of Hematology, University General Hospital, Av. Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 197 21 59/20 00x52553; fax: +34 96 197 21 59 (R. Collado), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain (G.T. Sáez).

E-mail addresses: [collado\\_ros@gva.es](mailto:collado_ros@gva.es) (R. Collado), [Guillermo.saez@uv.es](mailto:Guillermo.saez@uv.es) (G.T. Sáez).

<sup>1</sup> The first two authors contributed equally to this study.

of CLL, including immunophenotype, IGHV gene usage and mutational status and FISH-detected cytogenetic abnormalities [5,6]. However, the mechanisms of the transformation and evolution of MBL to CLL remain unclear. The absolute B-cell count at the time of MBL presentation remains the most significant predictive factor for progression. This has fuelled controversy with regard to diagnosis, clinical evolution and prognostic indicators [1–8].

Interestingly, genetic studies have demonstrated the importance of different mutations and deletions affecting specific chromosomal loci as predisposing factors in the development of leukaemia [9–11]. Although genes with highly penetrant germline mutations could be determinant for a proportion of familial CLL cases, no single gene has been identified as uniquely responsible. Furthermore, there have been reports of lowly penetrant alleles that predispose individuals for CLL or influence its clinical course [9–11]. Specifically, polymorphic variations mapping to the genes *FARP2*, *IRF4*, and *SP140* have been recently implicated in the aetiology of MBL risk [12].

In addition, environmental factors may contribute to the development of CLL. Exposure to chemicals such as benzene or pesticides can alter the regulation of genes involved in DNA repair

pathways and cause irreversible DNA damage and cancer susceptibility. Ganster et al. (2009) recently reported that specific DNA repair polymorphisms are associated with the unfavourable cytogenetic subgroups del(17p) and del(11q) in B-cell CLL [13].

CLL is affected by alterations in antioxidant enzymes and by oxidative stress, common features of transformed tumour cells. Oxidative stress plays a pivotal role in tumour initiation and progression. This may be the result of the enhanced production of reactive oxygen species (ROS), which have been proposed to increase genetic instability through their interactions with DNA and lead to the progressive accumulation of genetic mutations in oncogenes and/or tumour suppressor genes [14,15]. In CLL lymphocytes, increases in the oxidation products malondialdehyde (MDA) and the damaged DNA base 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) were accompanied by decreases in the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Increases in the oxidised/reduced glutathione (GSSG/GSH) ratio, a parameter indicative of oxidative stress, have likewise been reported in CLL lymphocytes [14,15]. The production of superoxide ions and secondary oxidative stress are intrinsic in leukaemia cells and are likely to be the mechanisms by which enhanced apoptosis is achieved by chemotherapy agents [16,17]. However, the role of oxidative stress in MBL remains poorly understood and is a matter of interest to the field. Because MBL is considered to be an early step in the development of CLL, the major aims of the present study were to determine whether the alterations in oxidative stress described in CLL are present during MBL and to assess the biological and clinical roles of oxidative damage in these lymphoproliferative disorders.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and diagnostic criteria

A total of 29 patients with MBL and 55 untreated patients diagnosed with CLL according to the IWCLL criteria [1] were enrolled in this study. As a control group, 31 healthy non-smokers were matched with the MBL and CLL patient group by age and sex. The clinical characteristics of the patients are summarised in Table 1.

### 2.2. Blood and urine sampling

Peripheral mononuclear cells were isolated from 10 mL heparinised blood by centrifugation over a Lymphoprep (Nycomed) layer at a density of 1.077 g/mL. Then, cells were washed twice with RPMI 1640 medium (Gibco BRL) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Table 1**

Characteristics of MBL and CLL patients.

	MBL (n = 29)		CLL (n = 55)		p-value
	(%)	Median (Q1–Q3)	(%)	Median (Q1–Q3)	
Age (years)		74.0 (70.0–77.0)		71.0 (63.0–76.5)	$p = 0.217^a$
Sex					
Male	65.5		54.5		$p = 0.332^c$
Female	34.5		45.5		
Clinical stage (Binet)*					
A	–		89.1		
B	–		9.1		
C	–		1.8		
Haemoglobin (g/dl)		14.7 (13.7–15.2)		13.8 (12.7–14.7)	$p = 0.026^a$
Leukocyte ( $\times 10^9/l$ )		12.0 (9.8–13.4)		28.6 (18.6–55.7)	$p < 0.001^b$
Lymphocyte ( $\times 10^9/l$ )		6.3 (5.1–7.3)		23.2 (13.5–52.1)	$p < 0.001^b$
Neutrophils ( $\times 10^9/l$ )		4.9 (3.9–5.7)		4.2 (3.4–6.5)	$p = 0.601^a$
Platelets ( $\times 10^9/l$ )		227.0 (194.0–259.0)		189.0 (151.0–234.5)	$p = 0.018^a$
LDH (U/l)		369.0 (351.0–402.0)		358.0 (303.5–436.5)	$p = 0.251^b$
$\beta_2$ -microglobulin (mg/l)		1.8 (1.5–2.5)		2.3 (1.5–2.9)	$p = 0.012^b$

Abbreviations: LDH, lactate dehydrogenase enzyme; MBL, monoclonal B lymphocytosis; CLL, Chronic lymphocytic leukaemia; Q1, percentile 25; Q3, percentile 75.

\* Binet et al. [18].

<sup>a</sup> Mann–Whitney U-test.

<sup>b</sup> Median test.

<sup>c</sup>  $\chi^2$ -test.

Twenty-four hour urine samples were collected in polyethylene bottles. For each, the sample volume was measured, and after shaking, the homogenised urine was aliquoted ( $2 \times 10$  mL) and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.3. Analyses of oxidative stress-related parameters

Catalase activity was measured using a catalase assay kit (707002; Cayman Chemical Company). The enzymatic conversion of methanol to formaldehyde in the presence of an optimal concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is measured using a plate reader with a 540 nm filter. The chromogen 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald; Aldrich chemical company, Milwaukee, WI, USA) was used for the detection. Samples were analysed as follows: mononuclear cells were homogenised on ice in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM EDTA. Formaldehyde standards were prepared from 0 to 75  $\mu\text{M}$ , and the formaldehyde concentration of the unknown samples was measured against the standard curve. One unit of catalase activity was defined as the amount of enzyme that caused the formation of 1 nmol of formaldehyde per minute per milligram of protein at  $25^{\circ}\text{C}$ .

The GSH content of cells was determined as previously described [19]. For the analysis of oxidised glutathione, samples were treated with N-ethylmaleimide and bathophenanthroline disulphonic acid and were derivatised and analysed by HPLC as previously described [20]. MDA levels were analysed by HPLC [21]. The protein content was measured using the Bradford method [22].

### 2.4. DNA isolation and enzymatic digestion

Cellular DNA was isolated following the method of Gupta [23] with the modification described by Muñiz et al. [24] in which chloroform isoamyl alcohol (24:1) is used in place of phenol for the removal of proteins. The isolated DNA was washed twice with 70% ethanol, dried, and dissolved in 200  $\mu\text{l}$  of a buffer composed of 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, and 100 mM NaCl, (pH 7.0) for enzymatic digestion. In brief, 5 mg DNA/ml (total DNA: 200 mg) was incubated with 100 units of DNase I in 40 ml 10 mM Tris/HCl and 10 ml 0.5 M  $\text{MgCl}_2$  (final concentration: 20 mM) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The pH of the reaction mixture was then lowered via the addition of 15 ml 0.5 M sodium acetate (pH 5.1); 10 ml nuclease P1 (5 units) and 30 ml 10 mM  $\text{ZnSO}_4$  were added (final concentration: 1 mM); and the mixture was incubated for 1 h. After readjusting the pH with 100 ml 0.4 M Tris/ClH (pH 7.8), followed by the addition of 20 ml alkaline phosphate (3 units), the samples were incubated for 30 min. Enzymes were precipitated with acetone (5 vol.), removed by centrifugation, and the supernatant was evaporated to dryness.

### 2.5. Lymphocyte 8-oxo-dG assay

The DNA hydrolysates were dissolved in HPLC grade water and filtered through a 0.2 mm syringe filter before the samples were applied onto a Waters ODS HPLC column ( $2.5 \times 0.46$  i.d.; 5  $\mu\text{m}$  particle size). The amounts of 8-oxo-dG and dG in the DNA digest were measured by electrochemical and UV absorbance detection, respectively, under the elution conditions previously described [25]. Standard samples of dG and 8-oxo-dG were analysed to assure their good separation and to allow the identification of those moieties derived from cell DNA.

### 2.6. Urinary 8-oxo-dG assay

We carried out the detection of 8-oxo-dG as described previously by Brown et al. [26]. Briefly, 100  $\mu$ L 3 mol/L Tris–EDTA solution (pH 8.6) was added to 1 mL urine and vortex-mixed for 30 s. The solution was then applied to a Bond Elute C18(OH)SPE (3 mL) column that had been prepared with 3 mL methanol and 3 mL water. The column was washed with 3 mL water followed by 3 mL 2.5% acetonitrile and 1.5% methanol in 10 mmol/L borate (pH 7.9). The sample was eluted with 3 mL of the same buffer and applied to a Bond Elute strong cation exchange column (3 mL) prepared with 3 mL methanol and 3 mL borate buffer (pH 7.9). The 8-oxo-dG was eluted with 2 mL acetonitrile/methanol buffer in borate and then adjusted to pH 6.0 with 1 mol/L HCl. Next, 4 mL 50:50 dichloromethane: propane-2-ol was added to 2 mL eluent, and the sample was vortex-mixed for 30 s. The sample was then centrifuged for 10 min at 3500 rpm, the upper aqueous layer was aspirated off, and a 3 mL aliquot of the organic layer was evaporated to dryness under nitrogen at 50 °C. Finally, the sample was reconstituted in 1 mL HPLC running buffer without acetonitrile, and 50  $\mu$ L was injected onto an HPLC column. To separate 8-oxo-dG, a Waters 515 HPLC pump model was used. This separation was carried out using a 5  $\mu$ m Spherisorb ODS2 column (4.6  $\times$  250 mm) with a flow rate of 1 mL/min. The buffer used was 50 mmol/L potassium phosphate (pH 5.1) in 5% acetonitrile, and the retention time was 7.5 min. To assess the optimisation and accuracy of the HPLC–EC assay in isolating and detecting 8-oxo-dG, the appropriate chromatograms of both the samples and the standards were recorded at the beginning of each working day. The 8-oxo-dG values were expressed as ratios to urine creatinine concentrations given in mmol/mL.

### 2.7. Urinary 8-isoprostane assay

To measure urinary 8-isoprostane, 8-isoprostane was extracted from urine samples using an immunoaffinity column (cat number 416358; Cayman Chemical Corp). Aliquots of 0.5 mL urine were applied directly to the columns, which were washed with 2 mL 0.1 mol/L PBS followed by two washes with 2 mL water. Then, urinary 8-isoprostane concentrations were measured with a commercial enzyme immunoassay (EIA) kit from Cayman Chemical (No. 516351). Readings were made at 405 nm in a Multiskan EX, Thermo Lab Systems. The results were expressed as ng 8-isoprostane/mmol creatinine.

### 2.8. Statistical analysis

Differences between groups were assessed using the  $\chi^2$ -test, the median test and the Mann–Whitney *U*-test, as appropriate. Categorical variables were expressed as percentages, and continuous variables were expressed as a median accompanied by percentile 25 (Q1) and percentile 75 (Q3). The statistical package SPSS, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), was used for all analyses. A two-sided *P* value below 0.05 was considered significant.

## 3. Results

The clinical characteristics of the MBL and CLL patients enrolled in the study are shown in Table 1. No differences were observed between groups in terms of age, sex, LDH or neutrophil counts. However, the number of leukocytes and lymphocytes was significantly higher in the CLL group ( $p < 0.001$ ), as expected. Moreover, platelets counts ( $p = 0.018$ ) and haemoglobin levels ( $p = 0.026$ ) were lower in patients with CLL, while  $\alpha_2$ -microglobulin was higher in these patients (2.30 mg/L) compared to those in the MBL group (1.80 mg/L) ( $p = 0.012$ ). These data confirm the understanding that CLL patients possess features of higher malignancy than do MBL subjects.

With regard to oxidative stress parameters, Table 2 summarises the GSH and GSSG levels and the catalase activities of both the healthy control and patients groups. We detected important changes between the assessed groups. Both reduced and oxidised glutathione forms were significantly increased in MBL and CLL patients compared with the control subjects. Therefore, the percentage values of the GSSG/GSH ratios, which are considered to be indicative of cell redox status, were approximately twofold higher in MBL (10.4%,  $p < 0.001$ ) and CLL (9.2%,  $p < 0.001$ ) cases than those observed in the control group (5.8%). On the other hand, the catalase activities of cells from the patient groups were significantly lower than the control group; no difference between the patient groups was observed.

Evidence of free radical activity in the two patient populations was detected in the form of lipid peroxidation by-products. The

levels of 8-isoprostane and MDA in urine and mononuclear cells, respectively, can be seen in Table 3. MDA levels were significantly higher in MBL (1.2 nmol/mg prot,  $p < 0.001$ ) and CLL (1.1 nmol/mg prot,  $p < 0.001$ ) patients compared to the control group (0.4 nmol/mg prot). However, no significant differences were observed in 8-isoprostane concentrations.

To investigate the occurrence of DNA damage, we measured 8-oxo-dG levels in mononuclear cells and urine (Table 4). It was evident that DNA oxidation was an important effect of oxidative stress in the patient population. The frequency of damaged bases in the lymphocytes of MBL (39.5 8-oxo-dG/ $10^6$  dG,  $p < 0.001$ ) and CLL (48.4 8-oxo-dG/ $10^6$  dG,  $p < 0.001$ ) patients was approximately eight times higher than in the healthy subjects (6.1 8-oxo-dG/ $10^6$  dG). In urine, we likewise detected increased 8-oxo-dG concentrations in the patient groups. There were no significant differences between patient groups.

As can be observed, all the analysed parameters, with the exception of 8-isoprostane, were markedly increased in patients compared to controls. However, no differences in oxidative status were detected when comparing MBL and CLL patients. The increases in the oxidative stress markers MDA, 8-oxo-dG and GSSG in lymphocytes and in urine, together with the decrease in antioxidant catalase activity, are indicative of the vulnerability of MBL and CLL cells to lipid peroxidation and DNA damage.

## 4. Discussion

Since its definition by Sies and Cadenas [27], oxidative stress, a state in which the persistent generation of ROS overwhelms cellular defences, has been related to a growing number of age-associated degenerative processes, including cancer diseases [28]. The high rates of lipid peroxidation and the different forms of DNA base lesions that result in genomic instability, such as strand breaks, base modifications and DNA–protein cross linkages, have been found in the majority of neoplastic tissues. ROS-mediated DNA damage plays an essential role in the initiation of carcinogenesis, as well as in malignant transformation [29]. In fact, oxidative stress has been observed to closely precede disease and to be responsible for the molecular alterations underlying the pathogenesis of tumour cells. In this way, the by-products of oxidative stress have similarly been proposed to be potential clinical markers of degenerative diseases [30].

In the present study, we selected two different stages of lymphocytosis, monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia in order to analyse their oxidative stress status. The evolution of flow cytometry and the introduction of automated blood counters in routine clinical practice have allowed the establishment of new diagnostic criteria. Previously, it was suggested that a B-cell threshold of  $5 \times 10^9$ /L could distinguish CLL from MBL [1]. The recent recognition of monoclonal B-cell lymphocytosis as a condition that may precede chronic lymphocytic leukaemia opens the door to studies aimed at examining the origin of the disease and the molecular events leading to overt chronic lymphocytic leukaemia.

Based on previous work, we knew that CLL cells were deficient in antioxidant enzymes and accumulated reactive oxygen and nitrogen species [14,15,31]. However, the scientifically important question remained whether MBL patients were similarly affected by oxidative damage. This study may provide clues to the mechanisms through which oxidative stress influences tumour growth and the clinical progression of MBL. To address this question, we have examined the GSSG/GSH ratio, the catalase activity and the levels of the oxidation products MDA, 8-isoprostane, and 8-oxo-dG in lymphocytes and urine specimens from untreated CLL and MBL patients and compared them with those of healthy subjects. Fig. 1 shows

**Table 2**  
GSH/GSSG and catalase activity in healthy subjects and patients with MBL and CLL.

	Controls (1)	MBL (2)	CLL (3)	p-value <sup>a</sup>		
	n = 31	n = 29	n = 55	(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(2) vs. (3)
	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)			
GSH (nmol/mg prot)	24.7 (22.6–27.3)	26.7 (24.1–30.0)	27.3 (24.8–33.2)	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.337
GSSG (nmol/mg prot)	1.6 (1.2–1.6)	2.8 (1.7–3.9)	2.5 (2.0–3.7)	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.814
GSSG/GSH (%)	5.8 (5.7–5.9)	10.4 (6.2–14.7)	9.2 (6.0–13.8)	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.624
Catalase (U/mg prot)	46.4 (32.4–64.7)	26.4 (21.6–38.8)	25.0 (21.3–33.3)	p = 0.002	p < 0.001	p = 0.869

Abbreviations: GSH, Reduced glutathione; GSSG, Oxidised glutathione; MBL, monoclonal B lymphocytosis; CLL, Chronic lymphocytic leukaemia; Q1, percentile 25; Q3, percentile 75.

<sup>a</sup> Mann–Whitney U-test.

**Table 3**  
Lipid peroxidation by-products in healthy subjects and patients with MBL and CLL.

	Controls (1)	MBL (2)	CLL (3)	p-value <sup>a</sup>		
	n = 31	n = 29	n = 55	(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(2) vs. (3)
	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)			
8-isoprostane (ng/mmol creatinine)	88.2 (80.4–105.3)	90.0 (46.2–132.8)	72.2 (52.5–94.7)	p = 0.345	p = 0.691	p = 0.293
MDA (nmol/mg prot)	0.4 (0.3–0.4)	1.2 (0.6–1.7)	1.1 (0.6–1.8)	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.587

Abbreviations: MDA, malondialdehyde; MBL, monoclonal B lymphocytosis; CLL, Chronic lymphocytic leukaemia; Q1, percentile 25; Q3, percentile 75.

<sup>a</sup> Mann–Whitney U-test.

**Table 4**  
8-oxo-dG in lymphocytes and urine of healthy subjects and patients with MBL and CLL.

	Controls (1)	MBL (2)	CLL (3)	p-value		
	n = 31	n = 29	n = 55	(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(2) vs. (3)
	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)	Median (Q1–Q3)			
8-oxo-dG lymphocytes (8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG)	6.1 (5.7–7.8)	39.5 (35.4–51.0)	48.4 (35.6–57.8)	p < 0.001 <sup>a</sup>	p < 0.001 <sup>a</sup>	p = 0.251 <sup>a</sup>
8-oxo-dG urine (nmol 8-oxo-dG/mmol creatinine)	11.0 (7.3–11.9)	15.1 (9.6–28.7)	14.6 (10.1–23.7)	p < 0.001 <sup>b</sup>	p < 0.001 <sup>b</sup>	p = 0.782 <sup>b</sup>

Abbreviations: 8-oxo-dG, 8-oxo-2'-deoxyguanosine; MBL, monoclonal B lymphocytosis; CLL, Chronic lymphocytic leukaemia; Q1, percentile 25; Q3, percentile 75.

<sup>a</sup> Median test.

<sup>b</sup> Mann–Whitney U-test.

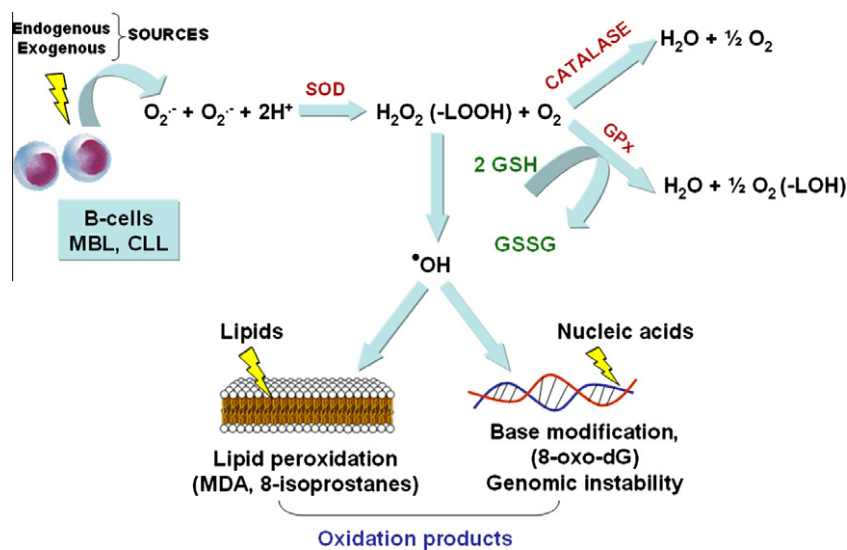
the relationships among the distinct metabolites and enzymes involved in ROS generation that were analysed in the present study.

There has been increasing interest in the measurement of thiols, glutathione in particular, as indicators of oxidative stress in the past few years. Glutathione is a key intracellular tripeptide thiol composed of glutamic acid, cysteine, and glycine. Glutathione helps protect cells from free radical damage by acting as an antioxidant. The oxidised/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) is used to evaluate the oxidative stress status of biological systems, and alterations in this ratio have been demonstrated in aging, cancer, HIV replication, and cardiovascular diseases [19,28]. In this study, the concentrations of GSH and GSSG were measured simultaneously in blood samples, and the GSH/GSSG ratio was calculated. As has been reported by Oltra et al. [15] and Ferraris et al. [31], GSH values were significantly higher in the circulating blood cells of CLL patients than in control subjects. Moreover, we observed a significant increase in GSH in MBL cases. However, Bakan et al. [14] have reported a decrease in GSH concentrations in the serum of CLL patients compared to healthy controls. These differences may be due to the low glutathione content of serum (0.5% of the blood content). Furthermore, in the work reported here, the oxidised form of the tripeptide increased significantly, yielding increased GSSG/GSH ratios in both MBL and CLL patients. Elevated GSSG concentrations could be related to the increase in glutathione peroxidase (GPx) found in CLL lymphocytes [14,32]. GPx is one of the most important enzymes for the detoxification of peroxides in living cells. This enzyme catalyses the reduction of hydrogen peroxide and a wide variety of organic peroxides to water and corresponding stable alcohols using

cellular glutathione as the reducing reagent. Alternatively, increases in GSH levels in MBL patients could be explained by changes in GSH synthesis as a result of GSH synthetase (GSS) activity. In an early report, Blume et al. observed the elevation of GSS in patients with myeloproliferative disorders [33].

To help protect against the destructive effects of ROS, aerobic organisms produce protective antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase. It was the evolution of these enzymes that made oxidative cellular metabolism possible. Catalases are ubiquitous hydrogen peroxide-detoxifying enzymes that are central to the cellular antioxidant response [27,28]. Interestingly, we observed a significant decrease (2-fold) in the catalase activities of MBL and CLL patients compared with the control group. These results agree with results reported by Oltra et al. [15] in work performed on CLL lymphocytes. Decreased levels of catalase may cause the accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumour cells [34].

Other indicators of free radical activity include isoprostanes. These molecules are the free radical-catalysed products of arachidonic acid that are formed *in situ* in cell-membrane phospholipids. A member of the F<sub>2</sub> isoprostane class, 8-isoprostane has been detected in the plasma and urine of humans, and its levels are increased in pathophysiological conditions in which oxidative stress is present [35,36]. Surprisingly, we detected no differences in the levels of urinary 8-isoprostane in the studied groups. However, an important increase (3-fold) in the levels of lipid peroxidation products was observed in the form of MDA production in both MBL and CLL patients. This apparent discrepancy may be explained



**Fig. 1.** The generation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes involved in MBL and CLL pathogenesis: ROS, generated by endogenous and exogenous sources, cause significant damage to B-cells in patients with MBL and CLL. An increase in ROS may overwhelm the antioxidant strategy, which is maintained by the coordination of the principal antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. This would allow the Haber–Weiss or Fenton reaction to take place, as well as the production of the hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) and the oxidative modification of membrane phospholipids and DNA. The non-enzymatic oxidation of arachyonic acid by ROS produces F8-isoprostane as a by-product, while DNA oxidation gives rise to the mutagenic base 8-oxo-dG, inducing gene instability and mutations. *Abbreviations:* MBL, monoclonal B lymphocytosis; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidised glutathione; MDA, malondialdehyde; 8-oxo-dG, 8-oxo-2'-deoxyguanosine.

by the fact that MDA is a relatively unspecific by-product of oxidative stress compared with 8-isoprostane.

The rate of DNA base oxidation and repair is a final interesting observation made as a part of this work. DNA damage was measured by detecting the mutagenic base 8-oxo-2'-deoxyguanosine. It must be emphasised that hydroxyl radicals can react with pyrimidines and/or purines, as well as chromatin proteins, resulting in base modifications and genomic instability, respectively, each of which can cause alterations in gene expression [29]. Genomic instability is a pivotal point of carcinogenesis [30]. However, the cause and maintenance of gene instability phenotypes is not known and requires further investigation. A recent study analysed the association of CLL with the incidence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in five DNA repair genes (XRCC1, ERCC2, ERCC4, XRCC3, and RAD51) [13]. The frequencies of the polymorphisms ERCC2 Lys751Gln, XRCC1 Arg399Gln, and ERCC4 Arg415Gln were found to be higher in patients with CLL compared to unaffected controls, especially in the group of patients with the unfavourable cytogenetic aberrations del(17p) and del(11q). Because a proportion of patients with CLL acquire new aberrations during the course of the disease, the emergence of these polymorphisms might be related to the acquisition of unfavourable cytogenetic aberrations that lead to poor outcomes over time [37].

We have confirmed that there are high levels of 8-oxo-dG in the lymphocytes of CLL and MBL patients. The presence of the damaged base in DNA has been found to cause GC to TA transversions [38,39], while in other studies ROS were shown to induce mutations in the hot-spot codons of the *TP53* gene [40], which confers a poor prognosis for CLL patients [41]. Here we report that, with regard to DNA damage, the increases in guanine oxidation in the lymphocytes of MBL and CLL patients were 6.5-fold and 8-fold higher, respectively, compared with the base levels of control subjects, while the release of 8-oxo-dG was approximately 1.4-fold higher in the patient group. These results indicate that guanine oxidations are intensive and are likely to overwhelm the maximal activity of DNA repair mechanisms. In addition, the increase in 8-oxo-dG in CLL lymphocyte DNA could be the result of a reduced capacity for repair, as has been previously reported [42].

In summary, there were no differences in oxidative status between MBL and CLL lymphocytes, indicating that impairments in oxidant stress are established in an early phase of the disease evolution. This is the first evidence of ROS-mediated DNA and lipid damage in MBL entity. Carcinogenesis is a multistep process, and these molecular alterations could be responsible for the progression of MBL to CLL, allowing the acquisition of genetic abnormalities. Puente et al. [43] have recently described recurrent mutations in *NOTCH1*, *MYD88*, and *XPO1* that contribute to the clinical evolution of CLL. Furthermore, genomic instability as the result of oxidative stress can promote additional non-recurrent mutations, such as the *CCND2* mutation detected in one CLL patient, relevant to the pathogenesis of CLL [43]. The results presented here could support the potential use of stress oxidative parameters as biomarkers for improved cancer diagnostics and therapeutic strategies. Although our understanding of the endogenous mechanisms of carcinogenesis by oxidative stress has advanced greatly in the last two decades, future studies will be necessary to identify conditions that better predict the risk of transformation into an active form of the disease that requires therapy.

#### Acknowledgements

Dr. Guillermo T. Sáez is grateful to the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Unión Europea), and the Fundación Investigación Clínico de Valencia-Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA) for research support.

#### References

- [1] M. Hallek, B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Döhner, P. Hillmen, M.J. Keating, E. Montserrat, K.R. Rai, T.J. Kipps, Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*, *Blood* 111 (2008) 5446–5456.
- [2] A.C. Rawstrom, F.L. Bennett, S.J. O'Connor, M. Kwock, J.A. Fenton, M. Plumier, R. de Tute, R.G. Owen, S.J. Richards, A.S. Jack, P. Hillmen, Monoclonal B-cells lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 575–583.

- [3] G. Dighiero, Monoclonal B-cell lymphocytosis—a frequent premalignant condition, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 638–640.
- [4] O. Landgren, M. Albitar, W. Ma, F. Abbasi, R.B. Hayes, P. Ghia, G.E. Marti, N.E. Caporaso, B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 659–667.
- [5] D. Rossi, E. Sozzi, A. Puma, L. De Paoli, S. Rasi, V. Spina, A. Gozzetti, M. Tassi, E. Cencini, D. Raspadori, V. Pinto, F. Bertoni, V. Gattei, F. Lauria, G. Gaidano, F. Forconi, The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors, *Br. J. Haematol.* 146 (2009) 64–75.
- [6] L. Scarfò, A. Dagklis, C. Scielzo, C. Fazi, P. Ghia, CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it?, *Semin Cancer Biol.* 20 (2010) 384–390.
- [7] N.E. Caporaso, G.E. Marti, O. Landgren, E. Azzato, J.B. Weinberg, L. Goldin, T. Shanafelt, Monoclonal B cell lymphocytosis: clinical and population perspectives, *Cytometry B. Clin. Cytom.* 78 (Suppl. 1) (2010) S115–S119.
- [8] T. Shanafelt, C.A. Hanson, Monoclonal B-cells lymphocytosis: definitions and natural history, *Leuk. Lymphoma* 50 (2009) 493–497.
- [9] A. Enjuanes, Y. Benavente, F. Bosch, I. Martin-Guerrero, D. Colomer, S. Perez-Alvarez, O. Rina, M.T. Ardanaz, P. Jares, A. Garcia-Orad, M.A. Pujans, E. Montserrat, S. De Sanjose, E. Campo, Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Res.* 68 (2008) 10178–10186.
- [10] M.C. Di Bernardo, D. Crowther-Swanepnel, P. Broderick, E. Webb, G. Selick, R. Wild, K. Sullivan, J. Vijayakrishnan, Y. Wang, A.M. Tittman, P. Hillmen, D.J. Allsup, J.R. Bailey, G. Pratt, C. Pepper, C. Fegan, J.M. Allan, D. Carovsky, R.S. Houlston, A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia, *Nat. Genet.* 40 (2008) 1204–1210.
- [11] S.L. Slager, N.E. Kay, Z.S. Fredericksen, A.H. Wang, J.M. Cunningham, C.M. Vachon, T.G. Call, J.R. Cerhan, Susceptibility genes and B-chronic lymphocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 139 (2007) 762–771.
- [12] D. Crowther-Swanepoel, T. Corre, A. Lloyd, G. Gaidano, B. Olver, F.L. Bennett, C. Doughty, D. Toniolo, F. Calligaris-Cappio, P. Ghia, D. Rossi, A.C. Rawstron, D. Catovsky, R.S. Houlston, Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis, *Blood* 116 (2010) 5957–5960.
- [13] C. Ganster, J. Neesen, S. Zehetmayer, U. Jäger, H. Esterbauer, C. Mannhalter, B. Kluge, C. Fonatsch, DNA repair polymorphisms associated with cytogenetic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Genes Chromosom. Cancer* 48 (2009) 760–767.
- [14] N. Bakan, S. Taysi, O. Yilmaz, E. Bakan, S. Kuşçay, N. Uzun, M. Gündoğdu, Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia, *Clin. Chim. Acta* 338 (2003) 143–149.
- [15] A.M. Oltra, F. Carbonell, C. Tormos, A. Iradi, G.T. Sáez, Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1286–1292.
- [16] Y. Zhou, E.O. Hileman, W. Plunkett, M.J. Keating, P. Huang, Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents, *Blood* 101 (2003) 4098–4104.
- [17] T.D. Shanafelt, Y.K. Lee, N.D. Bone, A.K. Strega, V.L. Narayanan, E.A. Sausville, S.M. Geyer, S.H. Kaufmann, N.E. Kay, Adaphostin-induced apoptosis in CLL B cells is associated with induction of oxidative stress and exhibits synergy with fludarabine, *Blood* 105 (2005) 2099–2106.
- [18] J.L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguat, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M.T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, F. Greymy, A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer* 48 (1981) 198–206.
- [19] J. Navarro, E. Obrador, J.A. Pellicer, M. Asensi, J. Viña, J.M. Estrela, Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 1203–1209.
- [20] R. Brigelius, C. Muckel, T.P.M. Akerboom, H. Sies, Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relation to glutathione disulfides, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2529–2534.
- [21] S.H.Y. Wong, J.A. Knight, S.M. Hopfer, O. Zaharia, C.N. Leach Jr., F.W. Sunderman Jr., Lipoperoxides in plasma as measured by liquid–chromatographic separation of malondialdehyde–thiobarbituric acid adduct, *Clin. Chem.* 33 (1987) 214–220.
- [22] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [23] R.C. Gupta, Non-random binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6943–6947.
- [24] P. Muñiz, V. Valls, C. Perez-Broseta, A. Iradi, J.V. Climent, M.R. Oliva, G.T. Sáez, The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 747–755.
- [25] M. Fandos, D. Corella, M. Guillen, O. Portoles, P. Carrasco, A. Iradi, M.A. Martinez-Gonzalez, R. Estruch, M.I. Covas, R.M. Lamuela-Raventos, M.T. Michavilla, C. Cerda, R. Torregrosa, J. Redon, F.F. Chaves, M.C. Tormos, D. Ocete, G.T. Sáez, Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population, *Free Radic. Res.* 43 (2009) 1179–1186.
- [26] R.K. Brown, A. McBurney, J. Lunec, F.J. Kelly, Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 801–806.
- [27] H. Sies, E. Cadenas, Oxidative stress: damage to intact cells and organs, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 311 (1985) 617–631.
- [28] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, fourth ed., Clarendon Press, Oxford, 2007.
- [29] D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, M.I. Panayiotidis, Reactive Oxygen Species (ROS)-Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis, *Mutat. Res.* 711 (2011) 167–173.
- [30] M. Panayiotidis, Reactive Oxygen Species (ROS) in multistage carcinogenesis, *Cancer Lett.* 266 (2008) 3–5.
- [31] A.M. Ferraris, M. Roffo, R. Mangerini, G.F. Gactani, Increased glutathione in chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes, *Am. J. Hematol.* 47 (1994) 237–238.
- [32] C.M. Farber, D.N. Kanganis, L.F. Liebeg, R. Silber, Antioxidant enzymes in lymphocytes from normal subjects and patients with chronic lymphocytic leukaemia: increased glutathione peroxidase activity in CLL B lymphocytosis, *Br. J. Haematol.* 72 (1989) 32–35.
- [33] K.G. Blume, N.V. Paniker, E. Beutler, Enzymes of glutathione synthesis in patients with myeloproliferative disorders, *Clin. Chim. Acta* 45 (1973) 281–285.
- [34] Y. Sun, Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis, *Free Radic. Biol. Med.* 8 (1990) 583–599.
- [35] J.D. Morrow, L.J. Roberts, The isoprostanes: current knowledge and directions for future research, *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996) 1–9.
- [36] P. Montuschi, P.J. Barnes, G. Ciabattani, Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath condensate, *Methods Mol. Biol.* 594 (2010) 73–84.
- [37] P. Economopoulou, V. Pappa, S. Papageorgiou, J. Dervenoulas, T. Economopoulos, Abnormalities of DNA repair mechanisms in common hematological malignancies, *Leuk. Lymphoma* 52 (2011) 567–582.
- [38] S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman, Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxo-dG, *Nature* 349 (1991) 431–434.
- [39] R.A. Floyd, The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1447–1450.
- [40] S.P. Hussain, F. Aguilar, P. Cerutti, Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248-and 249 of the human p53 gene, *Oncogene* 9 (1994) 2277–2281.
- [41] D. Gonzalez, P. Martinez, R. Wade, S. Hockley, D. Oscier, E. Matutes, C.E. Dearden, S.M. Richards, D. Catovsky, G.J. Morgan, Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 2223–2229.
- [42] A. Tuck, S. Smith, L. Larcom, Chronic Lymphocytic leukaemia lymphocytes lack the capacity to repair UV-induced lesions, *Mutat. Res.* 459 (2000) 73–80.
- [43] X.S. Puente, M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde, G.R. Ordoñez, N. Villamor, G. Escaramis, P. Jares, S. Bea, M. Gonzalez-Diaz, L. Bassaganyas, T. Baumann, M. Juan, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, J.M.C. Tubío, C. Lopez, A. Navarro, C. Tornador, M. Aymerich, M. Rozman, J.M. Hernandez, D.A. Puente, J.M.P. Freije, G. Velasco, A. Gutierrez-Fernandez, D. Costa, A. Carrio, S. Guijarro, A. Enjuanes, L. Hernandez, J. Yagüe, P. Nicolas, C.M. Romeo-Casabona, H. Himmelbauer, E. Castillo, J.C. Dohm, S. de Sanjose, M.A. Piris, E. de Alava, J. San Miguel, R. Royo, J.L. Gelpi, D. Torrent, M. Orozco, D.G. Pisano, A. Valencia, R. Guigo, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, P. Klatt, J. Marshall, K. Raine, L.A. Stebbings, P.A. Futreal, M.R. Stratton, P.J. Campbell, I. Gut, A. Lopez-Guillermo, X. Estivill, E. Montserrat, C. Lopez-Otin, E. Campo, Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia, *Nature* 475 (2011) 101–105.



## Research Article

# Increased Oxidative Damage Associated with Unfavorable Cytogenetic Subgroups in Chronic Lymphocytic Leukemia

Rosa Collado,<sup>1</sup> David Ivars,<sup>2</sup> Isabel Oliver,<sup>2</sup> Carmen Tormos,<sup>3</sup> Mercedes Egea,<sup>1</sup>  
Amparo Miguel,<sup>1</sup> Guillermo T. Sáez,<sup>3,4,5</sup> and Félix Carbonell<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service of Hematology, CDB-University General Hospital of Valencia, Avenida Tres Cruces 2, 46014 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Valencia, Avenida Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

<sup>3</sup> CIBERObn, Biomedical Network Research Centre in Physiopathology of Obesity and Nutrition, Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Avenida Blasco Ibáñez 13, 46010 Valencia, Spain

<sup>5</sup> Service of Clinical Analyses, CDB-University General Hospital of Valencia, Avenida Tres Cruces 2, 46014 Valencia, Spain

Correspondence should be addressed to Rosa Collado; collado\_ros@gva.es

Received 16 February 2014; Revised 30 May 2014; Accepted 11 June 2014; Published 26 June 2014

Academic Editor: Natarajan Muthusamy

Copyright © 2014 Rosa Collado et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Oxidative stress contributes to genomic instability in chronic lymphocytic leukemia (CLL), but its relationship with the acquisition of specific chromosomal abnormalities is unknown. We recruited 55 untreated CLL patients and assessed 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), glutathione, and malondialdehyde (MDA) levels, and we compared them among the cytogenetic subgroups established using fluorescence in situ hybridization (FISH). Significant increases in 8-oxo-dG and/or MDA were observed in patients with unfavorable cytogenetic aberrations (17p and 11q deletions) compared to the 13q deletion group. *TP53* deletion patients exhibited a diminished DNA repair efficiency. Finally, cases with normal FISH also showed enhanced 8-oxo-dG, which could result in adverse outcomes.

## 1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in Western countries and characterized by a variable clinical course, in which a portion of patients survive for long time periods without treatment, while others can experience early progression and subsequent death.

Based on fluorescence in situ hybridization (FISH) results, cytogenetic aberrations have been detected in 80% of patients with CLL. Patients with *del(17p13)* and *del(11q22-23)*, which affect the *TP53* and *ATM* genes, respectively, have an unfavorable outcome followed by patients with trisomy 12. In contrast, patients with *del(13q14)*, as the sole abnormality, exhibit prolonged survival times [1]. Recently, whole genome sequencing and improved culture techniques have provided additional information on novel recurrent alterations in CLL, such as mutations in *NOTCH1*, *SF3B1*,

*MYD88*, *XPO1*, and *BIRC3* genes, *IGH* translocations, and loss/gain of chromosome 8p/8q [2–4]. Interestingly, clonal evolution at the molecular level has been described in CLL. Tumor B-cells harbor different combinations of driver and passenger mutations that expand and evolve over time as response to changes in their local environment. This genetic diversity of cancer cells is essential for progression of the disease [5, 6].

On the other hand, accumulation of reactive oxygen species (ROS) results in a state of redox imbalance known as oxidative stress, which contributes to genomic instability. Previous analyses have demonstrated an impairment in the antioxidant defense system and an enhancement in the damaged DNA base 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) in both the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis and CLL [7, 8]. However, little is known regarding the relationship between the presence of oxidative damage

TABLE 1: Summary of clinical and cytogenetic characteristics of the CLL cases included in the present study.

Patient characteristics (n = 55)	
Age (years)	71 (47–92)
Male	30 (54.5%)
Binet stage	
A	49 (89.1%)
B	5 (9.1%)
C	1 (1.8%)
White blood cell count ( $\times 10^9/L$ )	28.6 (7.30–240.0)
Lymphocyte count ( $\times 10^9/L$ )	23.2 (5.6–233)
Hemoglobin (g/L)	13.8 (9.1–16.8)
Platelet count (9109/L)	189.0 (20.0–373.0)
Lactate dehydrogenase (U/L)	358.0 (115–1086.0)
$\beta 2$ -Microglobulin (mg/L)	2.3 (1.0–6.54)
ZAP70 positive* (n = 37)	22 (59.4%)
CD38 positive* (n = 45)	12 (26.6%)
FISH abnormalities	
del(13q14)	18 (32.7%)
Trisomy 12	8 (14.5%)
del(11q22)	6 (11.0%)
del(17p13)	6 (11.0%)
Normal FISH	17 (31.0%)

Values are given as median (range) or number (%).

\*Positivity was considered when ZAP70 > 20% and CD38 > 30%.

and the acquisition of specific chromosomal aberrations. The aim of the present study was to assess different oxidative stress biomarkers in the context of the recurrent cytogenetic subgroups established using FISH in CLL.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Patients.** The study included 55 untreated patients who were diagnosed with CLL according to IWCLL criteria [9]. This cohort was previously reported in Collado et al. [7] referring only to their oxidative stress status without relating to cytogenetic abnormalities pattern. All patients provided their written informed consent, and the study was performed according to the Helsinki declaration. The median age was 71 years (range: 47–92 years), and 89% of the subjects belonged to Binet stage A. The most important clinical and cytogenetic features of the studied patients are summarized in Table 1.

**2.2. Blood and Urine Sampling.** Heparinized whole blood was diluted with RPMI 1640 medium (Gibco BRL), and mononuclear cells were isolated by Lymphoprep (Nycomed) centrifugation. Cells were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Twenty-four-hour urine samples were collected and homogenized. Then, urine samples were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

**2.3. DNA Isolation and Enzymatic Digestion.** Cellular DNA was isolated following the method in which chloroform isoamyl alcohol (24 : 1) was used instead of phenol to remove proteins. Isolated DNA was washed twice with 70% ethanol,

dried, and dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, and 100 mM NaCl (pH 7.0) for enzymatic digestion. To this end 5  $\mu\text{g}$  of DNA/ $\mu\text{L}$  (total DNA content 200  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 100 units of DNase I in 40  $\mu\text{L}$  of Tris/HCl (10 mM) and 10  $\mu\text{L}$  of 0.5 M  $\text{MgCl}_2$  (final concentration: 20 mM) at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h. The pH of the reaction mixture was then lowered with 15  $\mu\text{L}$  of 0.5 M sodium acetate (pH 5.1); 10  $\mu\text{L}$  of nuclease P1 (5 units) and 30  $\mu\text{L}$  of 10 mM  $\text{ZnSO}_4$  were added to give a final concentration of 1 mM, and the mixture was incubated for 1 h. After adjusting the pH with 100  $\mu\text{L}$  of 0.4 M Tris/HCl (pH 7.8), followed by addition of 20  $\mu\text{L}$  of alkaline phosphate (3 units), the samples were incubated for 30 min. Enzymes were precipitated with acetone (5 volumes) and removed by centrifugation, and the supernatant was evaporated to dryness.

**2.4. Lymphocyte and Urinary 8-oxo-dG Assay.** The DNA hydrolysates were dissolved in HPLC grade water and filtered through a 0.2 mm syringe filter before the samples were applied onto a Waters ODS HPLC column ( $2.5 \times 0.46$  i.d.; 5  $\mu\text{m}$  particle size). The amounts of 8-oxo-dG and dG in the DNA digest were measured by electrochemical and UV absorbance detection, respectively, under the appropriated elution conditions. Standard samples of dG and 8-oxo-dG were analyzed to assure their good separation and to allow the identification of those moieties derived from cell DNA. To carry out the detection of urinary 8-oxo-dG, we followed the method described by Collado et al. [7]. The 8-oxo-dG values were expressed as ratios to urine creatinine concentrations given in mmol/mL.

**2.5. Glutathione and Lipid Peroxidation Assay.** Glutathione (GSH) content of cells was measured according to the method of Brigelius et al. [10]. Malondialdehyde (MDA) levels were analyzed by HPLC. Briefly, the technique employs the hydrolysis of plasma lipoperoxides by boiling in dilute phosphoric acid. MDA is one of the hydrolysis products and reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form MDA(TBA)<sub>2</sub> adduct, and plasma proteins are precipitated with methanol and removed from the reaction mixture by centrifugation. The resulting extract is fractionated by HPLC on a column of silica gel, to separate the MDA-TBA adduct, which finally is eluted with methanol/phosphate buffer and quantified spectrophotometrically at 532 nm.

**2.6. Fluorescence In Situ Hybridization.** Interphase FISH analyses were performed on fixed cells obtained from 72 h peripheral blood cultures stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA). The following probes were used: LSI ATM/CEP11, CEP12, LSI D13S319/LSI13q34, and LSI TP53/CEP17 (Abbot Co., Des Plaines, IL). Hybridization signals were evaluated under a fluorescence microscope (Eclipse E800, Nikon) equipped with a charge-coupled device (CCD) camera run by Cytovision software (Applied Imaging, Newcastle upon Tyne, UK). The number of interphase nuclei analyzed was 200 per sample. The cut-off values were 5% for CEP12 probe and 10% for LSI ATM/CEP11, D13S319/13q34, and TP53/CEP17 probes.

TABLE 2: Oxidative stress parameters and cytogenetic subgroups in CLL patients.

	del(13q14) <i>n</i> = 18 Mean ± SD	Trisomy 12 <i>n</i> = 8 Mean ± SD	del(11q22) <i>n</i> = 6 Mean ± SD	del(17p13) <i>n</i> = 6 Mean ± SD	Normal FISH <i>n</i> = 17 Mean ± SD	<i>P</i> value <sup>a</sup>
Lymphocytes 8-oxo-dG/10 <sup>6</sup> dG	39.40 ± 15.69	44.65 ± 12.26	43.58 ± 16.82	54.46 ± 21.66	57.17 ± 18.45	<b>0.034</b>
Urinary 8-oxo-dG (nmol/mmol creatinine)	19.70 ± 15.32	22.87 ± 15.13	27.31 ± 15.03	12.22 ± 4.50	18.76 ± 11.60	0.676
Glutathione (nmol/mg prot.)	28.28 ± 5.08	26.15 ± 5.75	35.48 ± 9.00	26.72 ± 6.35	28.30 ± 8.09	0.118
MDA (nmol/mg prot.)	1.14 ± 0.61	1.04 ± 0.74	2.09 ± 1.73	2.08 ± 0.78	1.48 ± 0.78	<b>0.050</b>

8-oxo-dG: 8-oxo-2-deoxyguanosine; MDA: malondialdehyde; SD: standard deviation.

<sup>a</sup>To determine whether there were any global significant differences between the means of cytogenetic subgroups, we performed the one-way analysis of variance (ANOVA) test.

**2.7. Statistical Analysis.** The normal distribution was tested using the Shapiro-Wilk test. One-way analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test were used to analyze differences among groups. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD). The statistical package SPSS, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), was used for all analyses. A two-sided *P* value ≤ 0.05 was considered significant.

### 3. Results and Discussion

CLL demonstrates a highly variable disease course, which is partly explained by the process of clonal evolution. Moreover, antioxidant and oxidative stress variations greatly influence genetic and epigenetic cascades underlying altered gene expression in human carcinogenesis [11]. However, the effect of oxidative stress levels on cytogenetic heterogeneity in CLL is unknown. This study included a cohort of 55 untreated patients. Interphase FISH analysis revealed eighteen patients with 13q14 deletion as the sole abnormality, eight patients with trisomy 12, six patients who presented deletion of *ATM* gene at 11q22-23, and six patients who harbored 17p13 deletion affecting the *TP53* gene. In seventeen cases, no abnormality was detected using the 4-probe panel. We measured the most representative oxidative stress parameters, such as 8-oxo-dG, and glutathione and malondialdehyde (MDA) levels in B-cells and urine from CLL patients and compared these values among the cytogenetic subgroups (Table 2).

Increasing knowledge regarding the use of new biomarkers in the early detection and followup of cancer has attracted attention within the last years. Repair of modified guanine prior to DNA replication is an essential feature for the maintenance of cell homeostasis because 8-oxo-dG is a mutagenic base that can result in GC → TA transversions. The frequency of mutations generated by 8-oxo-dG presence in mammalian cell DNA is 2.5–4.8%; therefore, increased levels of 8-oxo-dG may contribute to gene instability, affecting the normal function of oncogenes and tumor suppressor genes [12]. In lymphocytes from CLL patients, we detected global significant differences (*P* = 0.034) compared to the 8-oxo-dG levels among the five cytogenetic groups assessed. Interestingly, patients with a deletion in *TP53* and the normal FISH group showed higher concentrations of the damaged

base (54.46 ± 21.66 and 57.17 ± 18.45 8-oxo-dG/10<sup>6</sup> dG, resp.). As shown in Figure 1(a), significant increases in 8-oxo-dG level were observed in the normal FISH group compared with the favorable prognostic 13q deletion group (57.17 ± 18.45 versus 39.40 ± 15.69 8-oxo-dG/10<sup>6</sup> dG, *P* = 0.004). Similarly, we detected a trend towards significance (*P* = 0.071) when comparing patients with *TP53* and 13q deletions, which might be due to the small number of cases in the *TP53* deletion group. It has been widely established that activated p53 is involved in growth arrest, DNA repair, apoptosis, and senescence pathways. However, Sablina and colleagues [13] have recently postulated a new role for p53, suggesting that p53 may extend its protective function by participating in antioxidant defense. Genes such as *SOD2*, *GPX1*, *ALDH4A*, *HI95*, and *PA26* encode products that act as antioxidants and are modulated by p53. Moreover, downregulation of p53 elevates intracellular ROS, thereby increasing the mutation rate and karyotype instability. In these sense, Macedo et al. [14] also described increased oxidative damage in carriers of the germline *TP53* p.R337H mutation in families with Li-Fraumeni syndromes. Our data were consistent with these findings, where defective p53 derived from *TP53* deletion in CLL cells resulted in an increased level of 8-oxo-dG. The occurrence of important oxidized DNA base concentrations among patients with deletions and/or mutations of *TP53* in CLL may explain the poor prognosis observed in these cases, in addition to the involvement of *TP53* alterations in complex karyotypes [15, 16]. Furthermore, the observed DNA damage in the normal FISH group could contribute to the emergence of karyotypic aberrations with adverse prognostic features that have been previously described by Rigolin et al. [17] in one-third of CLL patients with normal FISH. In fact, two of our cases carried karyotypic abnormalities in regions not covered by the 4-probe FISH panel used. One case harbored a deletion del(12)(p12), and the other one showed a translocation t(2;7)(p21;q32).

On the other hand, 8-oxo-dG is present in the urine as a consequence of the base/nucleotide excision repair pathways [12]. Although no significant differences were found among urinary 8-oxo-dG levels in the present study, it is noteworthy that patients with *TP53* deletion exhibited lower concentrations (12.22 ± 4.50 nmol/mmol creatinine), suggesting a diminished DNA repair efficiency in this group. The mechanism underlying this decrease is still not known but

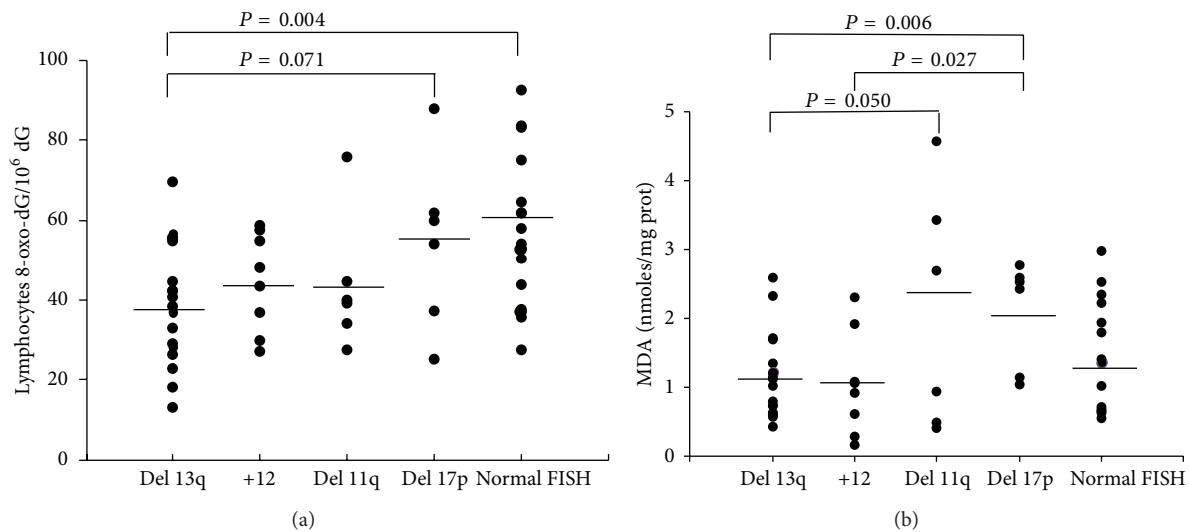


FIGURE 1: Analysis between cytogenetic subgroups with respect to (a) lymphocytes 8-oxo-dG/10<sup>6</sup> dG levels and (b) malondialdehyde-MDA levels. The mean value is shown for each group (*bars*). *P* values were determined on the basis of the Student's *t*-test.

is most likely due to an alteration in *OGGI* gene expression [12]. An additional important element in the antioxidant defense is ROS detoxification via the activation of glutathione peroxidase and elevation of thiols. Glutathione is an antioxidant intracellular thiol that is increased in circulating blood cells of CLL patients [7, 8]. However, we have not observed any differences among the analyzed cytogenetic subgroups. Likely, increases in the GSH levels were not sufficient to prevent oxidative stress in CLL cells.

Finally, lipid peroxidation may cause significant changes in the functional properties of biomembranes, resulting in altered cell signaling and in the release of toxic cellular products. In this study, we used MDA as a marker of lipid peroxidation. Differences in MDA levels among cytogenetic groups reached global statistical significance ( $P = 0.05$ ). Thus, we observed an association between plasma MDA content and poor prognosis genetic subgroups. CLL patients with *TP53* and *ATM* deletions demonstrated significantly higher MDA levels than patients with 13q deletions and trisomy 12 (Figure 1(b)). These results confirmed the findings observed by Macedo et al. [14] in *TP53* p.R337H carriers. In addition, Shiloh and Ziv [18] have recently proposed a role of *ATM* in regulating the cellular redox balance, indicating its effects on mitochondrial physiology. *ATM*-deficient cells have been associated with mitochondrial dysfunction. Consistent with this finding, lipid peroxidation observed in CLL patients with *ATM* deletions may disturb the mitochondrial membrane potential, thereby affecting its normal activity.

#### 4. Conclusions

Taken together, our results showed that B-cells from CLL patients with unfavorable cytogenetic aberrations were susceptible to injury caused by ROS, resulting in increased levels of oxidized DNA bases as 8-oxo-dG and/or lipid peroxidation. Because a portion of patients with CLL acquire

new aberrations during the course of the disease, we presumed that a deficiency in the *TP53* tumor suppressor gene could promote oxidation-mediated mutagenesis, thereby contributing to accelerated malignant progression. Moreover, attention must be focused on mutations resulting in altered activity of DNA repair mechanisms as well as polymorphisms of DNA repair genes that contribute to resistance to treatment with alkylating agents, such as chlorambucil, or with the purine analog fludarabine. Moreover, further studies are required to elucidate the genetic content of CLL patients with normal FISH. The occurrence of the new unfavorable *NOTCH1*, *SF3B1*, and *BIRC3* mutations in this patient group is an important issue that we have to analyze in the future.

Lastly, the present study supports the possibility of using antioxidants in combination with existing therapeutic strategies to improve survival in CLL patients. In this line, Jitschin et al. [19] have recently treated CLL cells with the antioxidant N-acetyl-cysteine (NAC). Oxidative stress attenuates immune responses by leading to dysfunctions and even apoptosis of NK- and T-cells, suggesting a role in tumor immune escape. The addition of NAC prevented CLL cell-mediated T-cell dysfunction. The authors concluded that treatment of CLL cells using antioxidants could neutralize endogenous ROS and protect the immune system. Such strategies have been successfully implemented in other hematological entities such as acute myeloid leukemia [20].

#### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

#### Authors' Contribution

Rosa Collado and David Ivars contributed equally to this study.

## Acknowledgments

This study was supported in part by the University of Valencia, Spain. G. T. Sáez obtained grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI10/0082, RD06/0045, and CB12/03/30016) and Generalitat Valenciana (ACOMP 2012-238).

## References

- [1] H. Döhner, S. Stilgenbauer, A. Benner et al., “Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 26, pp. 1910–1916, 2000.
- [2] C. Haferlach, F. Dicker, T. Weiss et al., “Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters,” *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 49, no. 9, pp. 851–859, 2010.
- [3] X. S. Puente, M. Pinyol, V. Quesada et al., “Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia,” *Nature*, vol. 475, no. 7354, pp. 101–105, 2011.
- [4] D. Rossi, S. Rasi, V. Spina et al., “Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia,” *Blood*, vol. 121, no. 8, pp. 1403–1412, 2013.
- [5] D. A. Landau, S. L. Carter, P. Stojanov et al., “Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia,” *Cell*, vol. 152, no. 4, pp. 714–726, 2013.
- [6] A. Schuh, J. Becq, S. Humphray et al., “Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns,” *Blood*, vol. 120, no. 20, pp. 4191–4196, 2012.
- [7] R. Collado, I. Oliver, C. Tormos et al., “Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis,” *Cancer Letters*, vol. 317, no. 2, pp. 144–149, 2012.
- [8] A. M. Oltra, F. Carbonell, C. Tormos, A. Iradi, and G. T. Sáez, “Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 30, no. 11, pp. 1286–1292, 2001.
- [9] M. Hallek, B. D. Cheson, D. Catovsky et al., “Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines,” *Blood*, vol. 111, no. 12, pp. 5446–5456, 2008.
- [10] R. Brigelius, C. Muckel, T. P. M. Akerboom, and H. Sies, “Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 32, no. 17, pp. 2529–2534, 1983.
- [11] D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, and M. I. Panayiotidis, “Reactive oxygen species (ROS)—induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis,” *Mutation Research—Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 711, no. 1-2, pp. 167–173, 2011.
- [12] B. Tudek, A. Winczura, J. Janik, A. Siomek, M. Foksinski, and R. Oliński, “Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging,” *American Journal of Translational Research*, vol. 2, no. 3, pp. 254–284, 2010.
- [13] A. A. Sablina, A. V. Budanov, G. V. Ilyinskaya, L. S. Agapova, J. E. Kravchenko, and P. M. Chumakov, “The antioxidant function of the p53 tumor suppressor,” *Nature Medicine*, vol. 11, no. 12, pp. 1306–1313, 2005.
- [14] G. S. Macedo, L. Lisbôa da Motta, J. Giacomazzi et al., “Increased oxidative damage in carriers of the germline TP53 p.R337H mutation,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, Article ID e47010, 2012.
- [15] R. Collado, J. Hueso, A. I. Cabello et al., “New translocations in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia: involvement of *ATM*, *MLL*, and *TP53* genes,” *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 169, no. 2, pp. 176–178, 2006.
- [16] J. Delgado, B. Espinet, A. C. Oliveira et al., “Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results,” *The British Journal of Haematology*, vol. 157, no. 1, pp. 67–74, 2012.
- [17] G. M. Rigolin, F. Cibien, S. Martinelli et al., “Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters,” *Blood*, vol. 119, no. 10, pp. 2310–2313, 2012.
- [18] Y. Shiloh and Y. Ziv, “The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more,” *Nature Reviews*, vol. 14, no. 4, pp. 197–210, 2013.
- [19] R. Jitschin, A. D. Hofmann, H. Bruns et al., “Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia,” *Blood*, vol. 123, no. 17, pp. 2663–2672, 2014.
- [20] M. Brune, S. Castaigne, J. Catalano et al., “Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial,” *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 88–96, 2006.



## **Anexo 2: Tablas**





**Tabla A.** Datos clínico-biológicos de los pacientes con LBM.

Paciente	Sexo/Edad	Leucos (x10 <sup>9</sup> /l)	Linfos (x10 <sup>9</sup> /l)	Neutros (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Hb (g/l)	LDH (U/l)	β <sub>2</sub> -micro (mg/l)
1	M/78	12.0	5.8	5.1	207	14.7	443	1.4
2	H/70	9.8	6.2	3.3	270	15.1	382	1.8
3	H/93	7.4	3.2	3.6	231	11.4	561	2.5
4	H/68	11.5	6.1	4.4	125	17.1	363	1.6
5	H/77	9.6	3.4	5.5	287	15.8	424	3.1
6	H/35	12.0	7.0	3.9	325	15.1	367	1.3
7	H/76	9.5	3.3	5.2	221	13.8	361	3.5
8	H/55	13.4	7.3	5.7	243	15.3	333	1.4
9	M/70	14.5	5.3	8.5	201	12.2	387	2.8
10	H/74	12.3	6.0	4.9	190	14.7	402	2.0
11	M /89	13.2	6.8	5.8	151	14.8	421	1.8
12	M/76	9.8	4.5	4.2	194	13.1	347	3.5
13	H/55	9.3	7.3	1.5	183	13.7	389	1.6
14	H/72	14.6	7.7	5.8	240	15.4	254	1.5
15	M/52	12.5	7.5	4.4	227	14.6	351	1.5
16	H/72	11.4	6.3	45.0	252	13.6	302	1.6
17	M/89	12.0	9.2	1.9	278	13.0	277	2.5
18	H/81	16.7	10.1	5.6	259	15.1	232	1.8
19	H/75	11.8	7.1	3.9	283	13.6	352	1.9
20	H/70	9.8	5.7	2.9	219	14.3	369	2.1

**Continuación Tabla A**

<b>Paciente</b>	<b>Sexo/Edad</b>	<b>Leucos (x10<sup>9</sup>/l)</b>	<b>Linfos (x10<sup>9</sup>/l)</b>	<b>Neutros (x10<sup>9</sup>/l)</b>	<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/l)</b>	<b>Hb (g/l)</b>	<b>LDH (U/l)</b>	<b>β<sub>2</sub>-micro (mg/l)</b>
<b>21</b>	H/79	12.7	6.3	5.2	238	15.3	426	2.1
<b>22</b>	H/77	10.4	5.1	5.1	215	14.8	358	2.2
<b>23</b>	M/77	13.7	7.2	4.7	359	14.1	521	1.6
<b>24</b>	H/61	15.1	9.7	4.5	151	15.2	328	1.5
<b>25</b>	H/64	16.5	9.9	5.9	276	16.3	359	1.7
<b>26</b>	H/83	8.6	3.2	4.5	253	11.4	402	2.5
<b>27</b>	M/76	11.8	5.1	5.9	183	13.9	444	1.7
<b>28</b>	H/74	16.6	9.0	6.6	201	18.3	376	2.2
<b>29</b>	M/72	7.9	4.2	2.9	170	14.0	389	2.7

H: hombre, M: mujer, N° de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, Hb: hemoglobina, LDH: lactato deshidrogenasa, β<sub>2</sub>-microglobulina.

**Tabla B.** Datos clínico-biológicos de los pacientes con LLC.

Paciente	Sexo/Edad	Meses Evolución	Estadio Binet	Morf.	CD38	ZAP-70	Leucos (x10 <sup>9</sup> /l)	Linfos (x10 <sup>9</sup> /l)	Neutros (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Hb (g/l)	LDH (U/l)	β <sub>2</sub> -micro (mg/l)
1	H/71	53	A	T	0	0	29.3	24.2	4.5	206	15.1	383	1.0
2	H/60	51	A	T	0		36.7	27.9	6.6	168	14.3	299	1.6
3	H/64	28	A	T	0	0	58.8	47.6	10.6	172	13.4	386	1.5
4	M/72	1	A	T	1	1	14.3	10.3	3.3	335	13.5	422	1.6
5	H/67	52	A	T	0	0	29.3	22.9	4.7	164	16.1	358	2.0
6	H/55	28	A	T	0		69.2	60.4	7.4	199	15.0	391	1.7
7	H/65	66	A	T	1	1	91.4	73.6	9.2	259	14.0	506	2.7
8	M/60	3	A	T	0	1	40.5	32.4	6.8	212	14.2	285	1.2
9	M/67	22	A	T	1		13.7	11.2	1.6	157	14.1	493	2.8
10	H/65	43	A	A	1	1	59.3	55.7	2.4	120	15.2	414	1.3
11	H/80	34	A	T	0	1	28.0	22.6	4.1	189	15.3	359	2.0
12	M/70	51	A	A	0		23.6	16.5	5.9	286	11.9	322	2.3
13	H/81	54	A	T	0	0	25.1	16.6	13.2	200	15.2	322	3.1
14	M/72	167	A	T	0		10.9	7.7	2.5	233	13.1	371	1.4
15	H/73	3	A	T	0	1	18.5	13.6	3.9	129	15.4	333	2.6
16	H/79	2	A	T			21.5	13.2	6.8	102	11.5	238	6.5
17	M/71	31	A	T	0	0	18.0	13.0	4.0	265	13.4	314	1.4
18	H/70	119	A	A	0	0	11.8	9.7	1.8	56	14.0	307	2.4
19	H/69	81	A	T			12.5	8.6	3.5	151	13.6	308	3.7
20	M/72	51	A	T	0	1	232.6	212.0	8.2	149	10.4	409	3.0
21	H/67	22	A	T	0	1	43.7	35.5	2.52	166	13.0	248	3.9
22	H/65	91	A	T	0	0	52.6	48.4	4.21	138	13.8	236	1.4
23	M/83	53	A	T			20.8	13.2	7.2	325	14.7	355	5.0

Continuación Tabla B

Paciente	Sexo/Edad	Meses Evolución	Estadio Binet	Morf.	CD38	ZAP-70	Leucos (x10 <sup>9</sup> /l)	Linfos (x10 <sup>9</sup> /l)	Neutros (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Hb (g/l)	LDH (U/l)	β <sub>2</sub> -micro (mg/l)
24	M/53	1	B	T			168.0	154.6	10.1	187	14.0	503	2.4
25	M/84	151	A	T			19.5	15.0	3.5	242	12.7	425	2.0
26	H/62	30	A	T	0	0	19.6	16.9	2.5	297	15.9	225	1.5
27	H/76	52	B	A	0		48.6	47.0	0.5	16	9.1	1086	3.2
28	H/47	85	A	A	0	0	18.6	11.3	5.5	340	16.8	308	1.1
29	H/83	1	B	T	1	1	7.3	5.6	1.2	178	12.0	325	4.4
30	H/57	5	A	T			11.1	7.5	1.8	134	12.4	481	3.9
31	H/59	184	A	T	0	1	44.1	38.4	4.4	128	14.0	268	1.0
32	H/67	24	A	T	1	1	28.1	19.8	6.8	212	14.2	258	3.2
33	M/61	180	A	T	0		65.4	56.9	5.2	138	14.3	2,88	1.7
34	M/59	0	A	A	1	1	43.5	34.5	5.3	218	12.8	506	1.4
35	H/66	6	A	A			120.7	118.3	3.4	236	14.2	483	2.2
36	M/87	21	A	T	0	1	12.6	8.8	2.6	173	13.9	374	2.9
37	M/75	23	A	T	0	1	33.0	28.4	4.0	373	15.7	291	2.2
38	H/62	1	A	A	1	1	95.3	84.0	3.6	228	12.5	348	3.0
39	M/77	2	A	T	0	1	23.8	15.7	6.9	278	13.2	477	2.3
40	M/55	126	A	T	0	0	240.0	233.0	7.2	216	13.9	361	1.4
41	H/56	37	B	T	0	1	116.1	102.0	6.4	151	13.0	374	2.7
42	M/76	3	B	A	1	1	39.0	31.0	4.7	205	11.6	778	3.9
43	M/92	88	A	T	0		25.0	18.0	6.3	263	10.5	377	2.7
44	M/85	49	A	T	0		44.0	37.9	5.0	180	11.3	299	5.1
45	M/81	27	A	T		1	21.5	15.6	4.9	225	11.3	455	2.6
46	M/77	3	A	T	0	0	29.0	24.2	4.0	188	13.6	448	2.2

**Continuación Tabla B**

Paciente	Sexo/Edad	Meses Evolución	Estadio Binet	Morf.	CD38	ZAP-70	Leucos (x10 <sup>9</sup> /l)	Linfos (x10 <sup>9</sup> /l)	Neutros (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Hb (g/l)	LDH (U/l)	β <sub>2</sub> -micro (mg/l)
47	M/75	22	A	T	0	0	18.1	13.5	4.1	243	12.4	295	2.3
48	M/79	38	A	A	0		24.6	193.0	3.8	253	13.8	115	2.7
49	H/75	180	A	T			14.0	7.8	5.6	206	16.2	336	1.1
50	H/75	118	A	T		0	120.5	108.2	9.6	162	14.8	300	3.0
51	H/60	0	C	A	1	1	220.0	218.4	2.2	36	11.0	720	1.6
52	H/72	187	A	T	0	0	18.0	13.7	3.5	102	15.1	346	2.3
53	M/73	71	A	T	1	1	68.2	64.5	3.1	135	12.8	537	2.7
54	M/81	15	A	T	1	1	28.6	23.2	4.2	232	13.2	479	2.7
55	H/67	21	A	T	0	0	18.6	14.1	3.8	170	16.0	346	1.3

H: hombre, M: mujer, N° de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, Hb: hemoglobina, LDH: lactato deshidrogenasa, β<sub>2</sub>-microglobulina. Morfología típica (T) de linfocitos B maduros/morfología atípica (A) (11-55 % prolinfocitos, <15% linfocitos figurados o hendidos o bien con aspecto linfoplasmocítico).

CD38 (0): negativo <30%; CD38 (1): positivo ≥30%.

ZAP-70 (0): negativo <20%; ZAP-70 (1): positivo ≥20%.



**Tabla C.** Marcadores de estrés oxidativo y resultados FISH en pacientes con LBM.

Paciente	MARCADORES ESTRÉS OXIDATIVO								RESULTADOS FISH			
	8-oxo-dG linfos	8-oxo-dG orina	8-isopros	MDA	Act. Catalasa	GSSG	GSH	GSSG/GSH %	Del(13q) %	+12 %	Del(11q) %	Del(17p) %
1	40.76	25.53	30.64	1.36	40.44	2.99	19.48	10.99	--	--	--	--
2	70.29	7.58	52.97	-	-	-	-	-	56.6	--	--	--
3	67.90	-	-	-	-	-	-	-	--	--	--	--
4	35.86	22.58	132.45	-	-	-	-	-	42.5	--	--	--
5	54.71	13.88	151.35	0.76	68.42	3.88	26.32	14.74	--	--	--	--
6	35.42	18.71	58.82	0.47	23.02	3.15	30.06	10.48	--	--	--	--
7	58.13	12.13	43.24	1.80	21.57	4.34	29.72	14.60	--	--	--	--
8	68.50	8.94	44.05	1.62	45.87	1.49	34.90	427	--	--	--	--
9	34.03	48.65	263.16	1.168		1.47	23.36	6.29	--	--	--	--
10	70.41	44.61	136.36	1.03	21.91	2.70	28.09	9.61	--	--	--	--
11	38.57	85.05	106.12	0.52	22.03	1.43	19.42	7.36	--	--	--	--
12	35.49	19.31	69.57	0.45	33.89	2.03	22.83	8.89	--	--	--	--
13	45.41	29.77	52.53	0.70	19.08	0.90	67.47	1.34	--	50.3	--	--
14	54.72	28.02	72.00	0.43		1.48	20.53	7.21	22.4	--	--	--
15	47.04	42.04	117.65	1.56	18.90	5.78	31.75	18.20	--	--	--	--
16	51.82	5.43	34.59	1.88	25.83	2.21	39.90	5.54	20.1	--	--	--
17	29.96	26.53	71.11	1.29	-	2.00	22.70	8.81	--	--	--	--
18	25.20	10.96	90.91	1.35	24.15	2.45	26.44	9.27	--	--	--	--
19	34.05	9.53	29.27	1.98	20.69	3.63	24.60	14.76	54.6	--	--	--

Continuación Tabla C

Paciente	MARCADORES ESTRÉS OXIDATIVO								RESULTADOS FISH			
	8-oxo-dG linfos	8-oxo-dG orina	8-isopros	MDA	Act. Catalasa	GSSG	GSH	GSSG/GSH %	Del(13q) %	+12 %	Del(11q) %	Del(17p) %
20	23.85	-	-	0.74	21.39	2.39	27.48	8.70	--	28.7	--	--
21	40.29	9.98	131.15	0.69	46.35	1.42	25.69	5.53	--	--	--	--
22	48.67	33.66	133.33	0.41	27.22	2,45	23.67	10.35	63.5	--	--	--
23	24.41	16.25	180.65	0.55	31.68	3.90	23.92	16.30	--	17.6	--	--
24	34.06	16.63	88.89	1.15	56.87	1.65	28.32	5.83	--	--	--	--
25	38.16	7.48	65.93	3.41	27.10	5.08	29.29	17.34	--	--	--	--
26	38.73	10.38	113.64	1.54	27.08	4.03	26.84	15.01	--	--	--	--
27	57.92	21.68	110.64	1.29	-	2.13	19.81	10.75	--	--	--	--
28	34.17	6.97	-	2.17	21.82	2.04	35.70	5.71	--	47.3	--	--
29	35.51	4.64	193.94	3.27	16.31	3.15	26.55	11.86	18.0	--	--	--



**Tabla D.** Marcadores de estrés oxidativo y resultados FISH en pacientes con LLC-B.

Paciente	MARCADORES ESTRÉS OXIDATIVO								RESULTADOS FISH			
	8-oxo-dG linfos	8-oxo-dG orina	8-isopros	MDA	Act. Catalasa	GSSG	GSH	GSSG/GSH %	Del(13q) %	+12 %	Del(11q) %	Del(17p) %
1	61.86	6.62	94.74	2.98	20.43	3.61	22.34	16,16	--	--	--	--
2	54.06	8.99	48.70	2.34	25.30	3.46	33.36	10,37	--	--	--	--
3	40.72	12.84	76.92	1.36	24.33	2.64	30.62	8,62	65.0	--	--	--
4	57.54	18.64	49.02	0.61	23.51	2.14	36.29	5,90	--	45.6	--	--
5	35.64	12.21	71.11	2.24	24.70	3.72	32.20	11,55	--	--	--	--
6	69.66	9.97	60.87	0.65	22.82	10.41	27.12	38,38	76.3	--	--	--
7	37.09	18.23	89.89	1.06	20.82	2.63	18.28	14,39	--	13.0	--	--
8	29.08	43.72	50.00	0.62	34.85	4.29	31.12	13,79	71.0	--	--	--
9	58.62	-	-	0.17	-	2.61	21.92	11,91	--	28.0	--	--
10	92.64	23.42	93.75	1.02	24.94	2.28	24.78	9,20	--	--	--	--
11	54.77	55.60	73.02	0.30	-	3.48	25.30	13,77	--	42.0	--	--
12	33.03	40.53	127.66	2.33	-	3.69	29.33	12,58	38.4	--	--	--
13	23.10	5.25	72.20	2.59	45.88	3.93	32.07	12,25	73.0	--	--	--
14	52.76	10.94	86.15	1.34	31.28	3.36	26.04	12,90	--	--	--	--
15	43.54	14.64	43.17	0.93	33.38	6.14	24.20	25,37	-	30.0	--	--
16	39.13	-	-	2.69	-	2.74	44.53	6,18	31.4	--	75.0	--
17	61.88	18.09	36.36	1.81	28.55	4.09	50.76	8,06	--	--	--	--
18	83.19	41.89	57.83	0.68	33.33	2.00	24.52	8,16	--	--	--	--
19	42.57	9.57	17.91	0.57	-	1.92	20.29	9,46	54.0	--	--	--

Continuación Tabla D

Paciente	MARCADORES ESTRÉS OXIDATIVO								RESULTADOS FISH			
	8-oxo-dG linfos	8-oxo-dG orina	8-isopros	MDA	Act. Catalasa	GSSG	GSH	GSSG/GSH %	Del(13q) %	+12 %	Del(11q) %	Del(17p) %
20	57.80	29.12	164.71	0.71	37.55	2.13	24.74	8.61	--	--	--	--
21	27.72	13.38	98.04	0.42	15.27	0.64	33.82	1.90	--	--	89.0	--
22	26.47	5.90	44.28	0.75	24.53	2.46	34.66	7.10	61.3	--	--	--
23	36.75	14.21	56.74	2.54	-	1.18	15.31	6.53	--	--	--	--
24	40.14	-	-	3.44	-	1.89	47.57	3.97	--	--	85.8	--
25	54.73	42.50	151.49	1.13	25.89	9.30	31.84	29.21	74.4	--	--	--
26	28.12	9.72	76.98	1.03	-	1.26	33.10	3.81	53.7	--	--	--
27	61.80	8.13	76.19	2.60	61.15	1.74	36.49	4.98	--	--	--	90.3
28	54.24	9.02	43.57	1.04		2.45	27.58	8.88	--	--	--	40.6
29	34.06	13.38	116.71	4.57	37.52	8.03	25.24	31.81	--	--	58.0	--
30	87.96	-	-	2.78	-	1.69	27.69	6.10	--	--	--	35.6
31	38.52	14.24	71.58	1.24	25.04	2.73	25.46	10.73	61.9	--	--	--
32	83.52	7.51	52.55	1.38	24.52	1.95	25.29	7.71	--	--	--	--
33	55.47	53.95	73.24	0.80	17.34	2.15	26.90	4.00	79.0	--	--	--
34	27.61	19.13	133.33	0.56	18.09	12.09	33.20	36.40	--	--	--	--
35	60.08	-	-	2.44	-	1.53	22.01	6.95	91.9	--	93.0	95.7
36	42.31	1.19	64.86	1.21	19.44	2.46	26.62	9.24	69.4	--	--	--
37	36.81	12.56	71.64	0.60	30.70	5.41	34.75	15.57	52.0	--	--	--
38	44.91	24.06	88.14	0.43	21.31	2.20	29.28	7.51	54.0	--	--	--
39	37.86	-	-	-	-	-	-	-	--	--	--	--
40	13.20	18.37	57.60	1.72	27.60	2.23	26.76	8.33	31.5	--	--	--

Continuación Tabla D

Paciente	MARCADORES ESTRÉS OXIDATIVO								RESULTADOS FISH			
	8-oxo-dG linfos	8-oxo-dG orina	8-isopros	MDA	Act. Catalasa	GSSG	GSH	GSSG/GSH %	Del(13q) %	+12 %	Del(11q) %	Del(17p) %
41	52.65	30.44	125.93	1.95	36.85	1.15	25.10	4.58	--	--	--	--
42	48.42	10.48	116.13	1.92	24.60	2.99	27.26	10.97	--	52.8	--	--
43	56.60	14.62	76.56	0.74	21.76	2.06	14.41	14.30	25.5	--	--	--
44	64.66	42.25	114.29	0.64	31.34	0.91	21.79	4.18	--	--	--	--
45	25.41	13.95	77.42	2.53	-	3.99	28.71	13.90	58.0	--	--	61.0
46	27.36	25.55	252.63	1.10	22.91	1.06	23.74	4.47	--	9.7	--	--
47	18.25	12.03	95.77	1.16	-	1.88	24.47	7.68	51.2	--	--	--
48	29.87	16.99	32.28	2.32	39.10	3.69	32.27	11.43	--	9.0	--	--
49	43.75	11.23	66.19	-	-	-			--	--	--	--
50	75.85	72.35	133.33	0.95	-	2.27	27.19	8.35	57.2	--	9.0	--
51	44.59	10.15	91.41	0.49	18.13	3.27	34.56	9.46	79.4	--	88.6	--
52	55.78	23.66	41.03	1.71	37.35	1.54	30.34	5.08	14.0	--	--	--
53	50.31	15.75	50.71	0.66	33.01	2.02	33.44	6.04	--	--	--	--
54	37.29	17.79	53.33	1.14	17.49	1.44	17.86	8.12	--	--	--	15.0
55	75.01	8.45	67.80	1.41	18.19	1.70	31.63	5.37	--	--	--	--

8-oxo-dG linfocitos: 8-oxo-dG/10<sup>6</sup> dG; 8-oxo-dG orina: nmol 8-oxo-dG/mmol creatinina; 8-isoprostanos: ng/mol creatinina; MDA: nmol/mg prot; GSSG: nmol/mg prot; GSH: nmol/mg prot; Actividad catalasa: U/mg prot.



## **Anexo 3: Protocolos**



## Protocolo 1: SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CM) MEDIANTE GRADIENTE DE DENSIDAD

### Material

---

Tubos estériles de 15 y 20 ml	Heparina sódica libre de conservantes (Rovi)
Pipetas estériles de 15 y 20 ml	Lymphoprep (Nycomed)
Pipetas Pasteur	Medios de cultivos RPMI 1640, Iscove (Gibco)
Jeringas	Centrífuga
Cámara de flujo laminar (Telstar)	

### Método (trabajar bajo la cámara de flujo laminar)

---

\* Muestra de sangre periférica (s.p.): en un tubo seco con 0.3 ml de heparina sódica, se recogen 10 ml de s.p.

Diluir la muestra con medio RPMI 1640 v/v en tubos estériles de 20 ml.

1. Preparar tubos estériles con 4 ml de Lymphoprep y añadir con cuidado 6 ml de muestra aproximadamente.
2. Centrifugar los tubos durante 30 min. a 1500 rpm y temperatura ambiente.
3. Recoger con pipetas Pasteur el anillo celular de aspecto blanquecino situado en la interfase de los medios y pasarlo a un nuevo tubo estéril.
4. Rellenar los tubos con 10 ml de medio RPMI 1640 y realizar un primer lavado centrifugando a 1200 rpm durante 20 min. a 4°C.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en medio RPMI 1640. Realizar un segundo lavado centrifugando durante 10 min. a 1200 rpm y 4°C.
6. Tras eliminar el sobrenadante, resuspender el botón celular en PBS y conservarlo a -80°C cuando la muestra estuviese destinada a determinaciones bioquímicas o en medio RPMI 1640 y a 4°C hasta su fijación.

## Protocolos

### Protocolo 2: EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

#### MATERIAL

---

Tubos cónicos de 10ml	Espectrofotómetro de masas
Proteinasa K (Sigma)	Dodecilsulfato de sodio (SDS) 20%
Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1	Cloruro sódico 4M
Etanol 100%	Etanol 70%

Baño  
Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 7.0)  
Tampón extracción ADN: Tris/CIH 1M, 150 mM NaCl 2 ml de EDTA (pH 8.0)

#### PROCEDIMIENTO

---

1. Descongelar las muestras almacenadas a -80 °C resuspendidas en PBS (células mononucleares) y coger de 100 a 300 µl y pasarlos a un tubo cónico de 10 ml.
2. Añadir los siguientes reactivos en este orden y voltear el tubo:
  - 2 ml de Tampón de extracción de ADN
  - 50 µl Proteinasa K
  - 100 µl SDS 20 %
3. Dejar en el baño durante 30 min. a 56°C y transcurrido ese tiempo bajar la temperatura a 37°C y dejar toda la noche.
4. Añadir un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (3 ml).
5. Centrifugar durante 15 min. a 3000 rpm y pasar el sobrenadante a otro tubo cónico de 10 ml.
6. Repetir el lavado con 3 ml de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y centrifugar con las mismas condiciones.
7. Pasar el sobrenadante a nuevos tubos y añadir 200 µl de cloruro sódico 4 M y 2 volúmenes de etanol 100 % (realizar unas inversiones de los tubos para mezclar bien).
8. Guardar a -20°C toda la noche.
9. Centrifugar durante 15 min. a 3000 rpm y desechar el sobrenadante y añadir 2 ml de etanol 70% al botón celular.
10. Centrifugar durante 15 min. a 3000 rpm.
11. Desechar el sobrenadante y secar los tubos boca abajo sobre un papel de filtro.
12. Resuspender con 200 µl de Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 7.0) y pasar a un eppendorff.



13. Cuantificar una alícuota de la muestra diluida 1:100 en agua destilada en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.
14. Sabiendo que 1 unidad de  $A_{260}$  equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN, se pudo calcular la concentración de la siguiente manera:

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \times 100 \text{ (}\mu\text{l/ml)}$$

$A_{260}$  (Absorbancia a 260nm)

100 (factor de dilución)

La pureza del ADN extraído vino determinada por la relación:

$$A_{260} / A_{280} = 1.7 - 1.9$$

## Protocolos

### Protocolo 3: DIGESTIÓN DE ADN

#### MATERIAL

---

Micropipetas de 10, 100 $\mu$ l y 1 ml	Nucleasa P1 (Sigma)
RNA-asa libre de DNA-asa (Sigma)	ZnSO <sub>4</sub> 10 mM
DNA-asa I (Sigma)	Tris/HCl 0.4 M (pH 7.8)
Acetato sódico 0.5 M (pH 5.1)	Fosfatasa alcalina (Sigma)
Baño	

#### PROCEDIMIENTO

---

15. Descongelar las muestras almacenadas a -80 °C resuspendidas en PBS (células mononucleares) y coger 200  $\mu$ l en un eppendorff.
16. Añadir 1  $\mu$ l de RNA-asa libre de DNA-asa (100 unidades) y dejar incubar en el baño durante 1h a 37°C.
17. Transcurrido este tiempo, añadir 100  $\mu$ l de DNA-asa e incubar otra hora a 37°C en el baño.
18. Bajar el pH a 5.1 añadiendo 15  $\mu$ l de acetato sódico 0.5 M.
19. A continuación, añadir 15  $\mu$ l de nucleasa P1 (5 unidades) y 30  $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> 10 mM e incubar 1h a 37°C en el baño.
20. Neutralizar el pH de la muestra con 100  $\mu$ l de Tris/HCl 0.4 M (pH 7.8) y añadir 20  $\mu$ l de fosfatasa alcalina (3 unidades).
21. Finalmente, incubar 1 h a 37°C en el baño y la muestra queda lista para la determinación de 8-oxo-dG por HPLC.

## Protocolo 4: FIJACIÓN CÉLULAS MONONUCLEARES

### Material

---

CIK 0.075 M	Pipetas Pasteur
Ácido Acético (Merck)	Centrífuga
Metanol (Merck)	Baño

### Obtención y Fijación de los cromosomas.

---

1. Recuperar las células mononucleares resuspendidas en medio RPMI 1640 conservadas a 4°C y centrifugarlas durante 10 min a 1000 rpm.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en una solución hipotónica 0.075 M de CIK precalentada a 37 °C. Incubar de 12-20 min a 37 °C.
3. Centrifugar los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Eliminar el sobrenadante y fijar el material añadiendo gota a gota la solución fijadora de Carnoy (3:1 metanol: ácido acético) y resuspender suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Centrifugar los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. A continuación, eliminar el sobrenadante y realizar de 1 a 3 lavados con Carnoy hasta conseguir una suspensión homogénea de aspecto blanquecino (tras cada lavado centrifugar en las mismas condiciones anteriores).
7. Tras el último lavado resuspender el material en una cantidad de Carnoy proporcional a la cantidad del mismo y almacenar a -20 °C hasta su utilización.

## Protocolos

### Protocolo 5: HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

#### Material

---

Portaobjetos	Tampón 20xSSc (Vysis)
Cubreobjetos	Sondas (Abbott)
Cubetas de tinción	DAPI II (Abbott)
Metanol (Merck)	Detergente NP-40 (Abbott)
Ácido acético (Merck)	Incubador HYBrite™ (Vysis)
Baño termostático	Microcentrífuga
Agua destilada estéril	Microscopio óptico y de fluorescencia
Micropipetas de 1 y 20 µl	Vórtex, Tubos Ependorff
Lápiz de diamante	Esmalte transparente
Pegamento de fácil eliminación (Marabu)	

#### Preparación de las muestras

---

1. Utilizar las suspensiones cromosómicas almacenadas a -20°C en solución fijadora de Carnoy (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético), obtenidas según el protocolo de fijación.
2. Expandir el material a hibridar mediante goteo sobre los portaobjetos previamente humedecidos con Carnoy.
3. Secar los preparados sobre una plancha durante 30 min.
4. Delimitar el área de hibridación marcando el reverso de los portaobjetos con un lápiz de punta de diamante o en su defecto con un rotulador permanente. Para ello se deben elegir campos con una concentración celular adecuada ( $\approx 100$  células/campo), ayudados del microscopio óptico.

#### Preparación de las sondas

---

Sacar las sondas del frigorífico/congelador y atemperarlas a temperatura ambiente durante unos 10 min aproximadamente, protegidas de la luz.

- **SONDAS ABBOTT**
  1. Diluir en un tubo Ependorff: 2 µl de sonda concentrada + 7 µl de tampón + 1 µl de sonda. La sonda centromérica del 12 ya viene premezclada lista para su uso. NOTA: si se utilizan 2 sondas a la vez mezclar: 1 µl de agua + 7 µl de tampón de hibridación + 1 µl de cada sonda.
  2. Mezclar suavemente en el vórtex.

## Codesnaturalización e Hibridación

---

1. Humedecer las laminillas de papel situadas en cada lateral de incubador HYBrite™ (Vysis) y colocar los portaobjetos en el incubador.
2. Aplicar 10 µl de la mezcla de hibridación sobre cada área seleccionada en los portaobjetos. Depositar con cuidado un cubreobjetos evitando la formación de burbujas y sellar con pegamento de fácil eliminación.
3. Seleccionar en el incubador los tiempos y temperaturas de desnaturalización e hibridación adecuadas para cada tipo de sonda:

<i>PROGRAMA HYBrite™</i>	<i>TIPOS DE SONDAS</i>	<i>CONDICIONES DESNATURALIZACIÓN</i>	<i>CONDICIONES HIBRIDACIÓN</i>
Programa 2	locus específico (y centroméricas)	75°C durante 1 min	37°C durante toda la noche

---

## Lavados posthibridación

---

1. Finalizada la hibridación retirar los cubres y sumergir los preparados inmediatamente en una cubeta que contenga tampón 0.4xSSC/0.3% NP-40 atemperado a 73°C. Agitar cada preparado 1-3 seg. y mantenerlos en el tampón durante 2min.  
NOTA: los tampones deben precalentarse al menos 30 min. antes de ser utilizados.
2. A continuación, colocar los preparados en otra cubeta con tampón 2xSSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente. Agitar cada preparado 1-3 seg. y mantenerlos en el tampón durante 1 min.
3. Secar los preparados en oscuridad a temperatura ambiente (≈ 15 min).  
NOTA: durante este tiempo sacar del congelador el DAPI para que se atempere y hacer un spin corto para recuperar todo el volumen de las paredes.

## Contratinción y visualización

---

1. Añadir 8 µl de DAPI (o IP) a cada área hibridada y depositar con cuidado un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
2. Sellar los cubreobjetos con goma de sellado o en su defecto con esmalte transparente.
3. Almacenar los preparados a -20°C en oscuridad.
4. Leer los preparados en un microscopio de fluorescencia dotado con los filtros adecuados. Valorar entre 200 y 500 núcleos en interfase o 20 metafases.

## Protocolos

### Protocolo 6: CUANTIFICACIÓN PROTEÍNAS MÉTODO DE LOWRY

#### MATERIAL

---

Reactivos Lowry (T<sup>a</sup> amb):

A: 40 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 8 g de NaOH + 500 ml agua

B: 200 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O + 400 mg de tartrato sodio-potasio + 500 ml agua

(Se mezclan 1:1 en el momento de su adición a las muestras)

BSA 2mg/ml (-20 °C)

Agua destilada

Folin 1N (T<sup>a</sup> amb) (Merck)

Eppendorfs estériles

Micropipetas de 10 y 100 µl y de 1 ml

Espectrofotómetro

#### MÉTODO

---

1. Descongelar la BSA en hielo y alicuotarla en eppendorfs rotulados del 1 al 12 según la siguiente tabla para hacer la recta patrón:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
µg BSA	0	0	5	5	10	10	25	25	50	50	75	75
µl BSA	0	0	2.5	2.5	5	5	12.5	12.5	25	25	37.5	37.5
µl H <sub>2</sub> O	100	100	97.5	97.5	95	95	87.5	87.5	75	75	62.5	62.5

2. Descongelar las muestras y alicuotarlas en eppendorfs siguiendo la numeración de la tabla (es aconsejable hacer cada muestra por duplicado). Las muestras se diluirán en agua destilada según se estime.

Nº Muestra											
Tubo	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
µl muestra											
µl H <sub>2</sub> O											
Abs.											

Nº Muestra											
Tubo	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
µl muestra											
µl H <sub>2</sub> O											
Abs.											

3. Preparar 1 ml del reactivo Lowry para todas las muestras, incluidos los patrones (1:1 A:B) y dejar reaccionar 10 min a t<sup>a</sup> ambiente.
4. Añadir 100 µl de Folin 1N (partimos de Folin 2N, hay que diluirlo con agua destilada 1:1) por muestra y patrones, y dejar reaccionar 30 min a t<sup>a</sup> ambiente.

(NOTA: encender el espectrofotómetro poco antes de hacer las mediciones)

5. Medir la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro.

6. Dibujar una recta patrón con las absorbancias de los patrones e interpolar los valores de las muestras para conseguir la cantidad de proteínas de cada muestra.

## Protocolos

### Protocolo 7: 8-oxo-dG en linfocitos

## MATERIAL

---

Columna Waters ODS HPLC (2.5x0.46 i.d. ; tamaño poro 5 µl)

Agua destilada filtrada (MilliQ)

TRIS-EDTA (3M-10mM)

Pipetas Pasteur

Tubos eppendorff

## PROCEDIMIENTO DE LAS MUESTRAS

---

1. Se disolvieron los hidrolizados de ADN en un gradiente de agua HPLC.
2. Se filtraron a través de un filtro de 0.2 µl.
3. Se inyectaron las muestras en una columna Waters ODS HPLC (2.5 x 0.46 i.d.; tamaño de poro 5 µm) a un flujo de 1ml/min.

## CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

---

**Columna:** Waters ODS HPLC (2.5 x 0.46 i.d.; tamaño de poro 5 µm)

**Fase móvil:** 50 mM Tampón fosfato potásico pH=5, 4% acetonitrilo.

**Flujo:** 1 ml/minuto.

**Tiempo de análisis:** 20 min/muestra.

**Tiempo de retención 8-oxo-dG:** 12-15 min (detector EC)

**Volumen inyección muestras:** 50 µl.

## CÁLCULOS

---

- La cantidad de 8-oxo-dG y deoxiguanosina (dG) en el ADN digerido se midió por detección electroquímica y ultravioleta (UV) respectivamente. También se analizaron patrones de dG y 8-oxo-dG para comprobar la correcta separación y poder identificar las bases derivadas del ADN celular.



## Protocolo 8: 8-oxo-dG EN ORINA

### MATERIAL

---

Columna SEP-PAK® CARTRIDGES PLUS	Diclorometano (Merck)
Columna de intercambio catiónico LCSCX	Parafilm
Metanol puro (Merck)	Tampón fosfato 50mM pH=5.0
Agua destilada filtrada (MilliQ)	500 ml ácido bórico 0.2 M
Tris-EDTA (3 M-10 mM)	500 ml de borax 0.05 M
Pipetas Pasteur	Medidor de pH
Tubos eppendorff	Tampón borato 10 mM pH=7.9
Tubos de cristal de 10ml	Acetonitrilo (Merck)
Isopropanol (Merck)	

### PREPARACIÓN COLUMNAS Y CONSERVACIÓN

---

- 1.- Lavar la columna SEP-PAK® CARTRIDGES PLUS Tc18 primero pasando 2 ml de metanol puro y desechar el eluyente y a continuación 2 ml de agua destilada filtrada y desechar de nuevo el eluyente.
- 2.- Lavar la columna de intercambio catiónico LCSCX primero pasando 3 ml de metanol puro y desechar el eluyente y a continuación 3 ml de solución B y desechar de nuevo el eluyente.

### PROCEDIMIENTO DE LAS MUESTRAS

---

4. Poner 1 ml de orina en tubos eppendorff y centrifugar 10 min. a 10000 rpm.
5. Pasar el sobrenadante a tubos eppendorff nuevos y añadir 100 µl de tampón Tris-EDTA (3 M 10mM pH= 8.6). Agitar 30 segundos en el vórtex.
6. Pasar la muestra por la columna SEP-PAK® CARTRIDGES PLUS y después pasar 9 ml de solución A.
7. Recoger el eluyente en un tubo de cristal de 10ml. (eluyente 1) y pasarlo por la columna de intercambio catiónico LCSCX. Recoger el eluyente en dos tubos (5ml/tubo).
8. Pasar 3ml de solución C (1.5 ml/tubo) por la columna de intercambio iónico y recoger el eluyente (eluyente 2).
9. Añadir 2 ml de isopropanol (1 ml/tubo) y 2 ml de diclorometano (1 ml/tubo) y agitar 30 segundos en el vórtex con el tubo tapado con parafilm.
10. Centrifugar 10 min. a 3000 rpm y recoger la fase inferior (fase orgánica) en un solo tubo.
11. Colocar los tubos en la estufa toda la noche a 50°C.

## Protocolos

12. Resuspender los cristales con 500  $\mu$ l de tampón fosfato 50 nM pH=5 y las muestras ya quedan listas para inyectar en el HPLC.

## CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

---

**Columna:** Spherisorb 5  $\mu$ m ODS2 4.6x250 mm (Waters).

**Fase móvil:** 50 nM Tampón fosfato potásico pH=5, 4% acetonitrilo.

**Flujo:** 1 ml/minuto.

**Tiempo de análisis:** 20 min/muestra.

**Tiempo de retención 8-oxo-dG:** 12-15 min (detector EC)

**Volumen inyección muestras:** 50  $\mu$ l.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

---

### Solución A:

- Preparar 500ml de ácido bórico 0.2 M y 500 ml de borax 0.05 M y medir el pH.
- Ajustar hasta un pH=7.9 añadiendo borax al ácido bórico.
- Diluir la solución hasta 10 mM y volver a ajustar el pH.
- Añadir a la solución 10 mM de tampón borato un 2.5% acetonitrilo y 1.5% metanol.

### Solución B:

Tampón borato 10 mM pH=7.9

### Solución C:

Tampón Borato 10 mM pH=7.9, 20% acetonitrilo y 20% metanol.

## CÁLCULOS

---

- Obtener los fmoles/volumen inyectado a partir de la recta de regresión obtenida de los estándares (recta patrón).
- Calcular este valor en fmoles/ml y pasar a nmoles/ml.
- Determinar la creatinina por el kit de la casa comercial SPINREACT.
- Expresar el resultado final como nmoles 8-oxo-dG/nmoles creatinina.

## Protocolo 9: CUANTIFICACIÓN CREATININA

### MATERIAL

---

Agua destilada  
Espectrofotómetro

Kit creatinina Spinreact cod nº 1001111  
Micropipetas 100 µl y 1 ml

### PROCEDIMIENTO

---

1. Diluir los 50 µl de orina con 450 µl de agua en un eppendorff (dilución 1:10).
2. Poner en cada cubeta 1 ml de reactivo "R" ( 50% hidróxido sódico + ácido pícrico).
3. Hacer un "blanco" sólo poniendo en la cubeta 1 ml de reactivo "R".
4. Blanco: Poner 100 µl de estándar en 1ml de "R" en una cubeta, agitar y medir la absorbancia a 492 nm en 30 segundos y 60 segundos.
5. Determinación de muestras: Rellenar la cubeta con 1ml de "R" y 100 µl de orina y agitar. Determinar la absorbancia en 30 segundos y 60 segundos (492nm).

### CÁLCULOS

---

$$[\text{CREATININA}] = \frac{(\text{Abs60seg} - \text{Abs30seg}) \text{ muestra}}{(\text{Abs60seg} - \text{Abs30seg}) \text{ estándar}} (\text{mg/dl}) \times 2 =$$

$$[\text{Creatinina}] = \text{mg/dl} \times 88.4 = \mu\text{moles/ml} \times \text{factor de dilución}$$

$$= \text{nmoles/ml} \times 10^{-6}$$

$$= \text{nmoles/ml}$$

## Protocolos

### Protocolo 10: DETERMINACIÓN GSH

#### MATERIAL

---

Micropipeta 100 $\mu$ l	Tiras de pH (Riedel-de Häen)
Pipetas Pasteur	Fluorodinitrobenceno 1 %
Tampón PCA GSH 12 %	Centrífuga
Tampón PCA GSH 6 %	Columna Waters ODS S5 NH <sub>2</sub>
KOH 3 M	Metacresol 10 mM

#### PROCEDIMIENTO

---

13. El primer paso es preparar los patrones que se tratarán a la vez que las muestras. La preparación queda descrita en la siguiente tabla:

Tubo 1	5 mg GSH	1.5 ml de PCA 6 %
Tubo 2	10 $\mu$ l tubo 1	90 $\mu$ l agua destilada
Tubo 3 (patrón 100 nmoles)	40 $\mu$ l tubo 2	360 $\mu$ l PCA 6 %
Tubo 4 (patrón 50 nmoles)	200 $\mu$ l tubo 3	200 $\mu$ l PCA 6 %
Tubo 5 (patrón 25 nmoles)	200 $\mu$ l tubo 4	200 $\mu$ l PCA 6 %
Tubo 6 (patrón 12.5 nmoles)	200 $\mu$ l tubo 5	200 $\mu$ l PCA 6 %
Tubo 7 (patrón 6.25 nmoles)	200 $\mu$ l tubo 6	200 $\mu$ l PCA 6 %

14. Poner 50  $\mu$ l de cada muestra para analizar en un eppendorf y añadir 50  $\mu$ l de PCA GSH 12 % a las muestras/patrones.
15. Centrifugar 5 min. a 10.000 rpm y recoger el sobrenadante en un nuevo eppendorf.
16. Añadir 20  $\mu$ l de metacresol 1 mM y ajustar hasta un pH de 10 (vira a color violeta) añadiendo KOH 3 M.
17. Añadir 300  $\mu$ l de fluorodinitrobenceno 1 % en etanol. Emplear guantes debido a la toxicidad.
18. Homogeneizar las muestras/patrones e incubar 4 h en oscuridad.
19. Transcurrido ese tiempo, centrifugar 10 min. a 10.000 rpm y recoger los sobrenadantes en los viales del carrusel del HPLC.

#### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

---

- Columna Waters ODS S5 NH<sub>2</sub> (0.052, 25 cm)
- Flujo 1 ml/min.

## Protocolo 11: DETERMINACIÓN GSSG

### MATERIAL

---

Micropipeta 100 µl	Tiras de pH (Riedel-de Häen)
Pipetas Pasteur	Fluorodinitrobenceno 1 %
Metanol 80 % (Merck)	Centrífuga
Tampón PCA GSSG 6 %	Columna Waters ODS S5 NH <sub>2</sub>
KOH 3 M	Metacresol 10 mM

### PROCEDIMIENTO

---

20. El primer paso es preparar los patrones que se tratarán a la vez que las muestras. La preparación queda descrita en la siguiente tabla:

Tubo 1 (patrón 50 nmol/ml)	100 µl GSSG	300 µl PCA GSSG 6 %
Tubo 2 (patrón 25 nmol/ml)	200 µl tubo 1	200 µl PCA GSSG 6 %
Tubo 3 (patrón 12.5 nmol/ml)	200 µl tubo 2	200 µl PCA GSSG 6 %
Tubo 4 (patrón 6.25 nmol/ml)	200 µl tubo 3	200 µl PCA GSSG 6 %
Tubo 5 (patrón 3.125 nmol/ml)	200 µl tubo 4	200 µl PCA GSSG 6 %

21. Poner 50 µl de cada muestra para analizar en un eppendorf y añadir 50 µl de PCA GSSG 6 % a las muestras/patrones.

22. Centrifugar 5 min. a 10.000 rpm y recoger el sobrenadante en un nuevo eppendorf.

23. Añadir 20 µl de metacresol 1 mM y ajustar hasta un pH de 10 (vira a color violeta) añadiendo KOH 3 M.

24. Añadir 300 µl de fluorodinitrobenceno 1 % en etanol. Emplear guantes debido a la toxicidad.

25. Homogeneizar las muestras/patrones e introducir en la estufa a 50°C hasta el día siguiente (abrir los eppendorfs).

26. Resuspender las muestras con 300-400 µl metanol 80 %.

27. Centrifugar durante 5 min. a 10.000 rpm y recoger los sobrenadantes en los viales del carrusel del HPLC.

### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

---

- Columna Waters ODS S5 NH<sub>2</sub> (0.052, 25 cm)
- Flujo 1 ml/min.

## Protocolos

### Protocolo 12: DETERMINACIÓN MDA

#### MATERIAL

---

Solución madre MDA	Baño termostatado
Micropipetas 100 µl y 1 ml	Centrífuga refrigerada
Agua destilada	
Tampón AcONa 2 M (pH 3.5) + TBA 0.2 %	
Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM (pH 6.8)	
Tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM (pH 3.5)	

#### PROCEDIMIENTO

---

28. El primer paso es preparar los patrones que se tratarán a la vez que las muestras. La preparación queda descrita en la siguiente tabla:

Tubo 1	410 µl MDA	500 µl agua destilada
Tubo 2 (MDA 5 mM)	500 µl tubo 1	500 µl agua destilada
Tubo 3 (patrón 50 nmol/ml)	100 µl tubo 2	900 µl agua destilada
Tubo 4 (patrón 25 nmol/ml)	500 µl tubo 3	500 µl agua destilada
Tubo 5 (patrón 12.5 nmol/ml)	500 µl tubo 4	500 µl agua destilada
Tubo 6 (patrón 5 nmol/ml)	200 µl tubo 5	800 µl agua destilada
Tubo 7 (patrón 2.5 nmol/ml)	500 µl tubo 6	500 µl agua destilada
Tubo 8 (patrón 1.25 nmol/ml)	500 µl tubo 7	500 µl agua destilada

29. Añadir a 50 µl de cada muestra/patrón 200 µl de tampón AcONa 2 M (pH 3.5) + TBA 0.2 %.

30. Incubar muestras/patrones durante 60 min. a 95°C y transcurrido ese tiempo guardarlas en hielo.

31. Añadir 200 µl de tampón tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 6.8) a cada muestra/patrón, agitar y centrifugar durante 5 min. a 10.000 rpm y 4°C.

32. Recoger 200 µl del sobrenadante y añadir 200 µl tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 3.5) y centrifugar durante 5 min. a 10.000 rpm y 4°C.

33. Colocar 200-300 µl del sobrenadante de las muestras/patrones y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.

#### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

---

- Columna C-18 Spherisorb de 12 cm de longitud y 5 µm de diámetro.
- Flujo 1.2 ml/min.
- Detección mediante detector UV-vis a 532 nm.

## Protocolo 13: DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CATALASA

### MATERIAL

---

- |                          |  |
|--------------------------|--|
| Agua ultrapura para HPLC | Micropipetas 100 $\mu$ l y 1 ml                |
| Propipeta automática     | Tubos estériles 10 ml                          |
| Pipetas 10 ml            | Lector placas (Multiskan EX, Termo Labsystems) |
| Agitador orbital         |  |
- Reactivos Kit Catalasa Cayman Chemical N° 707002
- Tampón ensayo (10x) (vial #1)
  - Tampón muestra (10x) (vial #2)
  - Estándar de formaldehído (vial #3)
  - Catalasa (control) (vial #4)
  - Hidróxido de potasio (vial #5)
  - Metanol (vial #6)
  - Peróxido de hidrógeno (vial #7)
  - Purpald (cromógeno) (vial #8)
  - Periodato potásico (vial #9)
  - Placa 96 pocillos (vial #10)

### PROCEDIMIENTO

---

34. Diluir el tampón de ensayo (vial #1): 2 ml del tampón de ensayo concentrado y 18 ml de agua ultrapura y también diluir el tampón de muestra (vial #2): 5 ml de tampón de muestra concentrado y 45 ml de agua para HPLC.
35. Diluir las muestras (células mononucleares) en el tampón de muestra diluido y alicuotar 20  $\mu$ l de cada dilución en una placa de 96 pocillos en su lugar correspondiente.
36. Preparar los **estándares de formaldehído**:
  - Diluir 10  $\mu$ l del estándar de formaldehído (vial #3) con 9.99 ml de tampón de muestra diluido para obtener solución stock de 4.25 mM de formaldehído.
  - Rotular 7 tubos de la A a la G y añadir la cantidad de stock de formaldehído y tampón de muestra que indica la siguiente tabla.

## Protocolos

Tubo	Formaldehído (µl)	Tampón de muestra (µl)	concentración final (µM formaldehído)
A	0	1000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

37. Añadir 100 µl de tampón de ensayo diluido y 30 µl de metanol en todos los pocillos de la placa.
38. Añadir 20 µl de estándar a los pocillos correspondientes.
39. Añadir 20 µl de muestra en los pocillos correspondientes.
40. Diluir la catalasa (control): reconstituir el vial en 2ml de tampón de muestra diluido y pasar por el vórtex. Diluir 100 µl de la enzima reconstituida en 1.9 ml de tampón de muestra diluido. Pipetear 20 µl de la enzima diluida en el pocillo correspondiente.
41. Diluir el peróxido de hidrógeno (vial #7) (estable 2 h): 40 µl de peróxido de hidrógeno + 9.96 ml de agua para HPLC.
42. Iniciar la reacción añadiendo 20 µl de peróxido de hidrógeno a todos los pocillos e incubar la placa 20 min. a temperatura ambiente en un agitador orbital.
43. Diluir el hidróxido de potasio (vial #5): mantener el vial en hielo y añadirle 4 ml de agua para HPLC fría. Pasar por el vórtex (tener precaución porque genera calor).
44. Añadir 30 µl de Purpald (vial #8) en cada pocillo e incubar 10 min. a temperatura ambiente en un agitador orbital.
45. A continuación. Añadir 10 µl de periodato potásico (vial #9) en cada pocillo e incubar 5 min. a temperatura ambiente en un agitador orbital.
46. Finalmente, leer la placa a 540 nm.

## CÁLCULO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

---

Las absorbancias obtenidas para cada muestra se interpolaron en una recta patrón obtenida con estándares de concentración de formaldehído conocida. El cálculo de la actividad de la enzima catalasa se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad catalasa} = \frac{\mu\text{M formaldehído muestra}}{20 \text{ min}} \times \text{dilución muestra} = \text{nmol/min/ml}$$



Una unidad catalítica de la enzima catalasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de formaldehído por minuto a 25 °C. Los valores se normalizaron con la concentración de proteínas de la muestra, y el resultado se expresó en U/mg proteína.

## Protocolos

### Protocolo 14: CUANTIFICACIÓN 8-ISOPROSTANOS EN ORINA

#### MATERIAL

---

Agua UltraPura	Puntas multicanal
Eppendorfs estériles	Lector placas (Multiskan EX, Thermo Labsystems)
Pipetas 10 ml	Micropipetas 20-200 µl y de 1 ml
Micropipetas multicanal de 5-100 µl y de 200-1000 µl	
Reactivos incluidos en el Kit de Cayman nº 516351	

#### PROCEDIMIENTO

---

7. Preparar el tampón de ensayo diluido: diluir el contenido de un vial de *EIA Buffer Concentrado* en 90 ml de agua UltraPura. Conservar a 4°C máximo dos meses.
8. Preparar el tampón de lavado diluido: diluir 5 ml del vial *Wash Buffer Concentrado* en un volumen final de 2 litros de agua UltraPura. A continuación añadirle 1 ml de Tween 20 (tener precaución ya que es muy denso).
9. Diluir las muestras de orina 1:40 con el tampón de muestra diluido en una placa de 96 pocillos estéril.
10. Preparación de los **estándares de 8-isoprostano**:
  - a. Diluir 100 µl del estándar 50 ng/ml en 900 µl de agua para obtener solución stock de 5 ng/ml.
  - b. Rotular 8 tubos del 1 al 8 y prepararlos según la siguiente tabla.

Tubo	Tampón muestra diluido(µL)	para	Concentración final
1	900	100 µl estándar 5ng/ml	500 pg/ml
2	750	500 µl tubo 1	200 pg/ml
3	750	500 µl tubo 2	80 pg/ml
4	750	500 µl tubo 3	32 pg/ml
5	750	500 µl tubo 4	12.8 pg/ml
6	750	500 µl tubo 5	5.1 pg/ml
7	750	500 µl tubo 6	2.0 pg/ml
8	750	500 µl tubo 7	0.8 pg/ml

11. Añadir los reactivos en los pocillos correspondientes según indica la siguiente tabla:

Pocillo	Tampón ensayo	Estándar/muestra	Tracer	Anticuerpo
Blanco	---	---	---	---
TA	---	---	---	---
NSB	100 µl	---	50 µl	---
Bo	50 µl	---	50 µl	50 µl
Sts/muestra	---	50 µl	50 µl	50 µl

12. Cubrir la placa e incubar 18 h a 4°C.
13. Transcurrido ese tiempo lavar la placa 5 veces con Tampón de lavado.
14. Añadir 5 µl de Tracer al pocillo de TA (actividad total).
15. Añadir 200 µl del reactivo de Ellman a todos los pocillos.
16. Cubrir la placa con la tapa e incubar en agitación suave a temperatura ambiente durante 90-120 min. en oscuridad.
17. Leer la Abs en un lector de placas a 405-420 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blk	Std1	Std1	m1	m1							
<b>B</b>	Blk	Std2	Std2	m2	m2							
<b>C</b>	NSB	Std3	Std3	...	...							
<b>D</b>	NSB	Std4	Std4									
<b>E</b>	Bo	Std5	Std5									
<b>F</b>	Bo	Std6	Std6									
<b>G</b>	Bo	Std7	Std7									
<b>H</b>	TA	Std8	Std8									

Blk: blanco  
 NSB: unión no específica  
 Bo: unión máxima  
 TA: actividad total

## CÁLCULO DE RESULTADOS

---

Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en una recta patrón y se normalizaron con la cantidad de creatinina presente en nuestras muestras. Los datos se expresaron en ng de 8-isoprostano/mmol creatinina.



# **Bibliografía**



- Abdul-Aziz, A., MacEwan, D. J., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. (2015). Oxidative Stress Responses and NRF2 in Human Leukaemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 454659. doi:10.1155/2015/454659
- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 306(1-2), 1–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282089>
- Agathangelidis, A., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Brochet, X., Murray, F., Yan, X.-J., ... Stamatopoulos, K. (2012). Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*, 119(19), 4467–75. doi:10.1182/blood-2011-11-393694
- Ahmad, R., Tripathi, A. K., Tripathi, P., Singh, R., Singh, S., & Singh, R. K. (2008). Oxidative stress and antioxidant status in patients with chronic myeloid leukemia. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 23(4), 328–33. doi:10.1007/s12291-008-0072-9
- Ahmad, R., Tripathi, A. K., Tripathi, P., Singh, R., Singh, S., & Singh, R. K. (2010). Studies on lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant status as indices of oxidative stress in patients with chronic myeloid leukaemia. *Singapore Medical Journal*, 51(2), 110–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20358148>
- Alagöl, H., Erdem, E., Sancak, B., Turkmen, G., Camlibel, M., & Bugdayci, G. (1999). Nitric oxide biosynthesis and malondialdehyde levels in advanced breast cancer. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 69(9), 647–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515337>
- Almeida, J., Nieto, W. G., Teodosio, C., Pedreira, C. E., López, A., Fernández-Navarro, P., ... Orfao, A. (2011). CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia*, 25(4), 718–22. doi:10.1038/leu.2010.305
- Almeida, J., Rodriguez-Caballero, A., Henriques, A., Criado, I., Teodosio, C., Nieto, W. G., ... Salamanca, G. de la L. de atención primaria de salud de. (2014). Epidemiología de la linfocitosis B monoclonal. *LVI Congreso Nacional de La Sociedad Española de Hematología Y Hemoterapia*, 84–87.
- Ames, B. N. (1989). Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Research*, 214(1), 41–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2671700>
- Ames BN, Saul R, Schwiers E, Adelman R, C. R. (1985). Oxidative DNA damage as related to cancer and aging: The assay of thymine glycol, Thymidine glycol, and hydroxymethyluracil in human and rat urine. In R. Press (Ed.), *Molecular Biology of Aging: Gene stability and gene expression* (Sohal RA,., pp. 137–144). New York.
- Antonini, E., Brunori, M., Greenwood, C., & Malmström, B. G. (1970). Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. *Nature*, 228(5275), 936–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4320510>

## Bibliografia

- Apollonio, B., Scielzo, C., Bertilaccio, M. T. S., Ten Hacken, E., Scarfò, L., Ranghetti, P., ... Caligaris-Cappio, F. (2013). Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *121*(19), 3879–88, S1–8. doi:10.1182/blood-2012-12-474718
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., & Gutteridge, J. M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *The Biochemical Journal*, *258*(2), 617–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1138407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Austen, B., Skowronska, A., Baker, C., Powell, J. E., Gardiner, A., Oscier, D., ... Stankovic, T. (2007). Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(34), 5448–57. doi:10.1200/JCO.2007.11.2649
- Babior, B. M. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *The New England Journal of Medicine*, *298*(13), 721–5. doi:10.1056/NEJM197803302981305
- Bakan, N., Taysi, S., Yilmaz, O., Bakan, E., Kuşkay, S., Uzun, N., & Gündoğdu, M. (2003). Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *338*(1-2), 143–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637279>
- Balatti, V., Bottoni, A., Palamarchuk, A., Alder, H., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., ... Croce, C. M. (2012). NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*, *119*(2), 329–31. doi:10.1182/blood-2011-10-386144
- Baliakas, P., Iskas, M., Gardiner, A., Davis, Z., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., ... Oscier, D. (2014). Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology*, *89*(3), 249–55. doi:10.1002/ajh.23618
- Bargonetti, J., & Manfredi, J. J. (2002). Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current Opinion in Oncology*, *14*(1), 86–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790986>
- Barocas, D. A., Motley, S., Cookson, M. S., Chang, S. S., Penson, D. F., Dai, Q., ... Fowke, J. H. (2011). Oxidative stress measured by urine F2-isoprostane level is associated with prostate cancer. *The Journal of Urology*, *185*(6), 2102–7. doi:10.1016/j.juro.2011.02.020
- Barzilai, A., Rotman, G., & Shiloh, Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair*, *1*(1), 3–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509294>
- Barzilai, A., & Yamamoto, K.-I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, *3*(8-9), 1109–15. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.002



- Battisti, V., Maders, L. D. K., Bagatini, M. D., Santos, K. F., Spanevello, R. M., Maldonado, P. A., ... Morsch, V. M. (2008). Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clinical Biochemistry*, *41*(7-8), 511–8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.01.027
- Bensaad, K., & Vousden, K. H. (2005). Savior and slayer: the two faces of p53. *Nature Medicine*, *11*(12), 1278–9. doi:10.1038/nm1205-1278
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., ... Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, *48*(1), 198–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7237385>
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G., & Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, *297*(8), 842–57. doi:10.1001/jama.297.8.842
- Blume, K. G., Paniker, N. V., & Beutler, E. (1973). Enzymes of glutathione synthesis in patients with myeloproliferative disorders. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *45*, 281–285.
- Bonvalet, D., Foldes, C., & Civatte, J. (1984). Cutaneous manifestations in chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, *10*(4), 278–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6231321>
- Bosch, F., Muntañola, A., Giné, E., Carrió, A., Villamor, N., Moreno, C., ... Montserrat, E. (2006). Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *70*(4), 214–7. doi:10.1002/cyto.b.20131
- Brachtl, G., Piñón Hofbauer, J., Greil, R., & Hartmann, T. N. (2014). The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology*, *93*(3), 361–74. doi:10.1007/s00277-013-1967-y
- Brune, M., Castaigne, S., Catalano, J., Gehlsen, K., Ho, A. D., Hofmann, W.-K., ... Hellstrand, K. (2006). Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. *Blood*, *108*(1), 88–96. doi:10.1182/blood-2005-10-4073
- Brys, M., Morel, A., Forma, E., Krzeslak, A., Wilkosz, J., Rozanski, W., & Olas, B. (2013). Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *372*(1-2), 149–53. doi:10.1007/s11010-012-1455-z
- Buhl, A. M., Jurlander, J., Jørgensen, F. S., Ottesen, A. M., Cowland, J. B., Gjerdrum, L. M., ... Leffers, H. (2006). Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *107*(7), 371–85. doi:10.1182/blood-2005-07-2615
- Buhmann, R., Kurzeder, C., Rehklau, J., Westhaus, D., Bursch, S., Hiddemann, W., ... Schoch, C. (2002). CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic

## Bibliografia

- leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 118(4), 968–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12199774>
- Caligaris-Cappio, F., & Hamblin, T. J. (1999). B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(1), 399–408. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458259>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., ... Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–9. doi:10.1073/pnas.242606799
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., ... Croce, C. M. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 353(17), 1793–801. doi:10.1056/NEJMoa050995
- Camphausen, K., Ménard, C., Sproull, M., Goley, E., Basu, S., & Coleman, C. N. (2004). Isoprostane levels in the urine of patients with prostate cancer receiving radiotherapy are not elevated. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 58(5), 1536–9. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.011
- Caporaso, N. E., Marti, G. E., Landgren, O., Azzato, E., Weinberg, J. B., Goldin, L., & Shanafelt, T. (2010). Monoclonal B cell lymphocytosis: clinical and population perspectives. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 78 Suppl 1, S115–9. doi:10.1002/cyto.b.20555
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–57. doi:10.1038/35025220
- Caron, J., & Krull, K. (2009). Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & ...*, (June), 551–556. doi:10.1002/pbc
- Casabonne, D., Almeida, J., Nieto, W. G., Romero, A., Fernández-Navarro, P., Rodríguez-Caballero, A., ... Orfao, A. (2012). Common infectious agents and monoclonal B-cell lymphocytosis: a cross-sectional epidemiological study among healthy adults. *PloS One*, 7(12), e52808. doi:10.1371/journal.pone.0052808
- Catera, R., Silverman, G. J., Hatzi, K., Seiler, T., Didier, S., Zhang, L., ... Chiorazzi, N. (2008). Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(11-12), 665–74. doi:10.2119/2008-00102.Catera
- Catovsky, D., Fooks, J., & Richards, S. (1989). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *British Journal of Haematology*, 72(2), 141–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2757960>

- Catovsky, D., Richards, S., Matutes, E., Oscier, D., Dyer, M. J. S., Bezares, R. F., ... Hillmen, P. (2007). Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, *370*(9583), 230–9. doi:10.1016/S0140-6736(07)61125-8
- Cavazzini, F., Hernandez, J. A., Gozzetti, A., Russo Rossi, A., De Angeli, C., Tiseo, R., ... Cuneo, A. (2008). Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *British Journal of Haematology*, *142*(4), 529–37. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07227.x
- Chapiro, E., Leporrier, N., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Mossafa, H., Leroux, D., ... Nguyen-Khac, F. (2010). Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leukemia Research*, *34*(1), 63–8. doi:10.1016/j.leukres.2009.03.042
- Chen, L., Apgar, J., Huynh, L., Dicker, F., Giago-McGahan, T., Rassenti, L., ... Kipps, T. J. (2005). ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *105*(5), 2036–41. doi:10.1182/blood-2004-05-1715
- Chena, C., Avalos, J. S., Bezares, R. F., Arrossagaray, G., Turdó, K., Bistmans, A., & Slavutsky, I. (2008). Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *European Journal of Haematology*, *81*(2), 94–9. doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01086.x
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Grever, M., Kay, N., Keating, M. J., O'Brien, S., & Rai, K. R. (1996). National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, *87*(12), 4990–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8652811>
- Chevallier, P., Penther, D., Avet-Loiseau, H., Robillard, N., Ifrah, N., Mahé, B., ... Garand, R. (2002). CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *116*(1), 142–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841407>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V, Ferracin, M., Shimizu, M., ... Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(39), 13944–9. doi:10.1073/pnas.0506654102
- Collado, R., Hueso, J., Cabello, A. I., Oliver, I., Egea, M., Orero, M., ... Carbonell, F. (2006). New translocations in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia: involvement of ATM, MLL, and TP53 genes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *169*(2), 176–8. doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.02.021
- Collado, R., Oliver, I., Tormos, C., Egea, M., Miguel, A., Cerdá, C., ... Sáez, G. T. (2012). Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis. *Cancer Letters*, *317*(2), 144–9. doi:10.1016/j.canlet.2011.11.018

## Bibliografia

- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., ... Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *348*(18), 1764–75. doi:10.1056/NEJMoa023143
- Crossen, P. E., & Horn, H. L. (1987). Origin of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *28*(1), 185–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3475165>
- Crowther-Swanepoel, D., Corre, T., Lloyd, A., Gaidano, G., Olver, B., Bennett, F. L., ... Houlston, R. S. (2010). Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*, *116*(26), 5957–60. doi:10.1182/blood-2010-07-294975
- Cuneo, A., Wlodarska, I., Sayed Aly, M., Piva, N., Carli, M. G., Fagioli, F., ... Cassiman, J. J. (1992). Non-radioactive in situ hybridization for the detection and monitoring of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *81*(2), 192–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1643016>
- Cuttner, J. (1992). Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Investigation*, *10*(2), 103–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1551021>
- Dagklis, A., Fazi, C., Sala, C., Cantarelli, V., Scielzo, C., Massacane, R., ... Ghia, P. (2009). The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood*, *114*(1), 26–32. doi:10.1182/blood-2008-09-176933
- Dagklis, A., Fazi, C., Scarfo, L., Apollonio, B., & Ghia, P. (2009). Monoclonal B lymphocytosis in the general population. *Leukemia & Lymphoma*, *50*(3), 490–2. doi:10.1080/10428190902763475
- Dal Bo, M., Rossi, F. M., Rossi, D., Deambrogi, C., Bertoni, F., Del Giudice, I., ... Gattei, V. (2011). 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *50*(8), 633–43. doi:10.1002/gcc.20885
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *329*(1-2), 23–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589963>
- Dameshek, W. (1967). Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, *29*(4), Suppl:566–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6022294>
- Damle, R. N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X.-J., ... Chiorazzi, N. (2002). B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, *99*(11), 4087–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010811>

- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., ... Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477712>
- De Rosa, A., Zappavigna, S., Villa, M. R., Improta, S., Cesario, E., Mastrullo, L., ... Stiuso, P. (2015). Prognostic role of translocator protein and oxidative stress markers in chronic lymphocytic leukemia patients treated with bendamustine plus rituximab. *Oncology Letters*, *9*(3), 1327–1332. doi:10.3892/ol.2014.2817
- Del Giudice, I., Rossi, D., Chiaretti, S., Marinelli, M., Tavolaro, S., Gabrielli, S., ... Foà, R. (2012). NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*, *97*(3), 437–41. doi:10.3324/haematol.2011.060129
- Del Poeta, G., Maurillo, L., Venditti, A., Buccisano, F., Epiceno, A. M., Capelli, G., ... Amadori, S. (2001). Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *98*(9), 2633–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675331>
- Del Principe, M. I., Del Poeta, G., Buccisano, F., Maurillo, L., Venditti, A., Zucchetto, A., ... Amadori, S. (2006). Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *108*(3), 853–61. doi:10.1182/blood-2005-12-4986
- Delgado, J., Espinet, B., Oliveira, A. C., Abrisqueta, P., de la Serna, J., Collado, R., ... Gonzalez, M. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *British Journal of Haematology*, *157*(1), 67–74. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09000.x
- Devi, G. S., Prasad, M. H., Saraswathi, I., Raghu, D., Rao, D. N., & Reddy, P. P. (2000). Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *293*(1-2), 53–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699422>
- Dewald, G. W., Brockman, S. R., Paternoster, S. F., Bone, N. D., O'Fallon, J. R., Allmer, C., ... Kay, N. E. (2003). Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *121*(2), 287–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694251>
- Di Bernardo, M. C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., ... Houlston, R. S. (2008). A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, *40*(10), 1204–10. doi:10.1038/ng.219
- Dicker, F., Schnittger, S., Haferlach, T., Kern, W., & Schoch, C. (2006). Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*, *108*(9), 3152–60. doi:10.1182/blood-2006-02-005322

## Bibliografía

- Dighiero, G. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis--a frequent premalignant condition. *The New England Journal of Medicine*, 359(6), 638–40. doi:10.1056/NEJMe0804663
- Dighiero, G., & Binet, J. L. (2000). When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 343(24), 1799–801. doi:10.1056/NEJM200012143432410
- Djordjevic, P., Zelen, I., Ristic, P., Jovanovic, I., Jakovljevic, V., Baskic, D., ... Arsenijevic, N. (2009). Oxidative stress accelerates spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 14(2), 281–7. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650179>
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., ... Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 343(26), 1910–6. doi:10.1056/NEJM200012283432602
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., James, M. R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., ... Lichter, P. (1997). 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 89(7), 2516–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9116297>
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–27. doi:10.1016/j.plipres.2003.10.001
- Economopoulou, P., Pappa, V., Papageorgiou, S., Dervenoulas, J., & Economopoulos, T. (2011). Abnormalities Economopoulou P, Pappa V, Papageorgiou S, Dervenoulas J, and Economopoulos T (2011) Abnormalities of DNA repair mechanisms in common hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 52:567–82. of DNA repair mechanisms in common hematological maligna. *Leukemia & Lymphoma*, 52(4), 567–82. doi:10.3109/10428194.2010.551155
- Edelmann, J., Holzmann, K., Miller, F., Winkler, D., Bühler, A., Zenz, T., ... Döhner, H. (2012). High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, 120(24), 4783–94. doi:10.1182/blood-2012-04-423517
- Eichhorst, B., & Hallek, M. (2007). Revision of the guidelines for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 20(3), 469–77. doi:10.1016/j.beha.2007.02.002
- Einhorn, S., Burvall, K., Juliusson, G., Gahrton, G., & Meeker, T. (1989). Molecular analyses of chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 3(12), 871–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2586180>
- Enjuanes, A., Benavente, Y., Bosch, F., Martín-Guerrero, I., Colomer, D., Pérez-Alvarez, S., ... Campo, E. (2008). Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research*, 68(24), 10178–86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2221

- Er, T.-K., Tsai, S.-M., Wu, S.-H., Chiang, W., Lin, H.-C., Lin, S.-F., ... Liu, T.-Z. (2007). Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clinical Biochemistry*, 40(13-14), 1015–9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.05.013
- Espinet, B., & Puiggros, A. (2014). Aspectos genéticos y moleculares de la linfocitosis B monoclonal. *LVI Congreso Nacional de La Sociedad Española de Hematología Y Hemoterapia*.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567(1), 1–61. doi:10.1016/j.mrrev.2003.11.001
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabani, H., Ma, J., ... Gaidano, G. (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1389–401. doi:10.1084/jem.20110921
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., ... Chiorazzi, N. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(8), 1515–25. doi:10.1172/JCI3009
- Fam, S. S., & Morrow, J. D. (2003). The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Current Medicinal Chemistry*, 10(17), 1723–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871112>
- Farber, C. M., Kanganis, D. N., Liebes, L. F., & Silber, R. (1989). Antioxidant enzymes in lymphocytes from normal subjects and patients with chronic lymphocytic leukaemia: increased glutathione peroxidase activity in CLL B lymphocytes. *British Journal of Haematology*, 72(1), 32–5. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786733>
- Farquhar, M. J., & Bowen, D. T. (2003). Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes. *International Journal of Hematology*, 77(4), 342–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774921>
- Faucher, F., Doublé, S., & Jia, Z. (2012). 8-oxoguanine DNA glycosylases: one lesion, three subfamilies. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6711–29. doi:10.3390/ijms13066711
- Fazi, C., Scarfò, L., Pecciarini, L., Cottini, F., Dagklis, A., Janus, A., ... Ghia, P. (2011). General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood*, 118(25), 6618–25. doi:10.1182/blood-2011-05-357251
- Fegan, C., Robinson, H., Thompson, P., Whittaker, J. A., & White, D. (1995). Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia*, 9(12), 2003–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609709>

## Bibliografia

- Ferraris, A. M., Rolfo, M., Mangerini, R., & Gaetani, G. F. (1994). Increased glutathione in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *American Journal of Hematology*, 47(3), 237–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7942792>
- Floyd, R. A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(9), 1447–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205403>
- Forconi, F., Rinaldi, A., Kwee, I., Sozzi, E., Raspadori, D., Rancoita, P. M. V., ... Bertoni, F. (2008). Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *British Journal of Haematology*, 143(4), 532–6. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07373.x
- Fracchiolla, N. S., Bamonti Catena, F., Novembrino, C., Ippolito, S., Maisonneuve, P., & Cortelezzi, A. (2003). Possible association between reactive oxygen metabolites and karyotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 88(5), 594–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745280>
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6290784>
- Fridovich, I. (1976). Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In Pryor (Ed.), *Free radicals in biology* (Academic P., pp. 239–277). New York.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science (New York, N.Y.)*, 201(4359), 875–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/210504>
- Gahrton, G., Robèrt, K. H., Friberg, K., Zech, L., & Bird, A. G. (1980). Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*, 56(4), 640–7. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6968231>
- Ganster, C., Neesen, J., Zehetmayer, S., Jäger, U., Esterbauer, H., Mannhalter, C., ... Fonatsch, C. (2009). DNA repair polymorphisms associated with cytogenetic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 48(9), 760–7. doi:10.1002/gcc.20680
- García-Marco, J. A., Price, C. M., Ellis, J., Morey, M., Matutes, E., Lens, D., ... Catovsky, D. (1996). Correlation of trisomy 12 with proliferating cells by combined immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 10(11), 1705–11. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892671>
- Garg, R., Wierda, W., Ferrajoli, A., Abruzzo, L., Pierce, S., Lerner, S., ... O'Brien, S. (2012). The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 118(14), 3531–7. doi:10.1002/cncr.26593
- Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M. I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., ... Del Poeta, G. (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111(2), 865–73. doi:10.1182/blood-2007-05-092486



- Geisler, C. H., Philip, P., Christensen, B. E., Hou-Jensen, K., Pedersen, N. T., Jensen, O. M., ... Hansen, M. M. (1997). In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leukemia Research*, *21*(11-12), 1011–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9444933>
- Gerber, M., Astre, C., Ségala, C., Saintot, M., Scali, J., Simony-Lafontaine, J., ... Pujol, H. (1996). Oxidant-antioxidant status alterations in cancer patients: relationship to tumor progression. *The Journal of Nutrition*, *126*(4 Suppl), 1201S–7S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642457>
- Ghia, P., Guida, G., Scielzo, C., Geuna, M., & Caligaris-Cappio, F. (2004). CD38 modifications in chronic lymphocytic leukemia: are they relevant? *Leukemia*, *18*(10), 1733–5. doi:10.1038/sj.leu.2403504
- Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., ... Caligaris-Cappio, F. (2003). The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, *101*(4), 1262–9. doi:10.1182/blood-2002-06-1801
- Ghia, P., Prato, G., Scielzo, C., Stella, S., Geuna, M., Guida, G., & Caligaris-Cappio, F. (2004). Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*, *103*(6), 2337–42. doi:10.1182/blood-2003-09-3277
- Greco, M., & Capello, D. (2013). Analysis of SF3B1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematological ...*, (March 2012), 54–55. doi:10.1002/hon
- Grubor, V., Krasnitz, A., Troge, J. E., Meth, J. L., Lakshmi, B., Kendall, J. T., ... Esposito, D. (2009). Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood*, *113*(6), 1294–303. doi:10.1182/blood-2008-05-158865
- Gunawardana, C., Austen, B., Powell, J. E., Fegan, C., Wandroo, F., Jacobs, A., ... Moss, P. (2008). South Asian chronic lymphocytic leukaemia patients have more rapid disease progression in comparison to White patients. *British Journal of Haematology*, *142*(4), 606–9. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07226.x
- Gunn, S. R., Hibbard, M. K., Ismail, S. H., Lowery-Nordberg, M., Mellink, C. H. M., Bahler, D. W., ... Robetorye, R. S. (2009). Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *23*(5), 1011–7. doi:10.1038/leu.2008.393
- Gupta, R. C. (1984). Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(22), 6943–7. Retrieved from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=392052&tool=pmcentrez&endertype=abstract>

## Bibliografía

- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12 Pt 2), 1819–28.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7497639>
- Gutteridge, J. M., & Wilkins, S. (1983). Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 759(1-2), 38–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6192847>
- Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W., & Haferlach, T. (2007). Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, 21(12), 2442–51. doi:10.1038/sj.leu.2404935
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., ... Kipps, T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111(12), 5446–56. doi:10.1182/blood-2007-06-093906
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), 1–8.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2191627>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free radicals in biology and medicine, fourth ed.*, (fourth edi.). Clarendon Press, Oxford.
- Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., & Oscier, D. G. (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 99(3), 1023–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807008>
- Haslinger, C., Schweifer, N., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Lichter, P., Kraut, N., ... Abseher, R. (2004). Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(19), 3937–49. doi:10.1200/JCO.2004.12.133
- Heerema, N. A., Byrd, J. C., Dal Cin, P. S., Dell' Aquila, M. L., Koduru, P. R. K., Aviram, A., ... Van Dyke, D. L. (2010). Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 203(2), 134–40. doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.07.128
- Henriques, A., Rodríguez-Caballero, A., Nieto, W. G., Langerak, A. W., Criado, I., Lécresse, Q., ... Orfao, A. (2013). Combined patterns of IGHV repertoire and cytogenetic/molecular alterations in monoclonal B lymphocytosis versus chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*, 8(7), e67751. doi:10.1371/journal.pone.0067751

- Hernández, J. A., Rodríguez, A. E., González, M., Benito, R., Fontanillo, C., Sandoval, V., ... Hernández, J. M. (2009). A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, *94*(3), 364–71. doi:10.3324/haematol.13862
- Hernandez, J. M., Mecucci, C., Criel, A., Meeus, P., Michaux, I., Van Hoof, A., ... Michaux, J. L. (1995). Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. *Leukemia*, *9*(12), 2140–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609731>
- Hernandez-Nieto, L., Montserrat-Costa, E., Muncunill, J., & Rozman, C. (1977). Bone-marrow patterns and clinical staging in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, *1*(8024), 1269. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/68376>
- Hervé, M., Xu, K., Ng, Y.-S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B. T., ... Meffre, E. (2005). Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(6), 1636–43. doi:10.1172/JCI24387
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R., & Harris, C. C. (1996). Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Research*, *24*(1), 141–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145616&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Honda, M., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ichinose, H., & Kamihira, S. (2000). Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leukemia Research*, *24*(6), 461–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781678>
- Hopkins, J., & Tudhope, G. R. (1973). Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *British Journal of Haematology*, *25*(5), 563–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4518624>
- Huh, Y. O., Schweighofer, C. D., Ketterling, R. P., Knudson, R. A., Vega, F., Kim, J. E., ... Abruzzo, L. V. (2011). Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic features. *American Journal of Clinical Pathology*, *135*(5), 686–96. doi:10.1309/AJCPOEFP3SLX6HXJ
- Ibrahim, S., Keating, M., Do, K. A., O'Brien, S., Huh, Y. O., Jilani, I., ... Albitar, M. (2001). CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *98*(1), 181–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418478>
- Isham, C. R., Tibodeau, J. D., Jin, W., Xu, R., Timm, M. M., & Bible, K. C. (2007). Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood*, *109*(6), 2579–88. doi:10.1182/blood-2006-07-027326

## Bibliográfia

- Iwata, K., Shibuya, H., Ohkawa, Y., & Inui, N. (1984). Chromosomal aberrations in V79 cells induced by superoxide radical generated by the hypoxanthine-xanthine oxidase system. *Toxicology Letters*, 22(1), 75–81.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6547789>
- Jagłowski, S. M., Ruppert, A. S., Heerema, N. A., Bingman, A., Flynn, J. M., Grever, M. R., ... Andritsos, L. A. (2012). Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 159(1), 82–7. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09239.x
- Jain, N., & O'Brien, S. (2012). Chronic lymphocytic leukemia with deletion 17p: emerging treatment options. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 26(11), 1067, 1070. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330347>
- Jain, P., Keating, M., Wierda, W., Estrov, Z., Ferrajoli, A., Jain, N., ... O'Brien, S. (2015). Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) after discontinuing ibrutinib. *Blood*. doi:10.1182/blood-2014-09-603670
- Jankowska, A. M., Gondek, L. P., Szpurka, H., Nearman, Z. P., Tiu, R. V, & Maciejewski, J. P. (2008). Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 22(3), 551–8. doi:10.1038/sj.leu.2405055
- Jeromin, S., Weissmann, S., Haferlach, C., Dicker, F., Bayer, K., Grossmann, V., ... Schnittger, S. (2014). SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*, 28(1), 108–17. doi:10.1038/leu.2013.263
- Jitschin, R., Hofmann, A. D., Bruns, H., Giessler, A., Bricks, J., Berger, J., ... Mougiakakos, D. (2014). Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123(17), 2663–72. doi:10.1182/blood-2013-10-532200
- Juliussen, G., Oscier, D. G., Fitchett, M., Ross, F. M., Stockdill, G., Mackie, M. J., ... Gahrton, G. (1990). Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *The New England Journal of Medicine*, 323(11), 720–4. doi:10.1056/NEJM199009133231105
- Kamiya, H., Murata-Kamiya, N., Karino, N., Ueno, Y., Matsuda, A., & Kasai, H. (2002). Induction of T → G and T → A transversions by 5-formyluracil in mammalian cells. *Mutation Research*, 513(1-2), 213–22.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719107>
- Karhu, R., Knuutila, S., Kallioniemi, O. P., Siltonen, S., Aine, R., Vilpo, L., & Vilpo, J. (1997). Frequent loss of the 11q14-24 region in chronic lymphocytic leukemia: a study by comparative genomic hybridization. Tampere CLL Group. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 19(4), 286–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9258665>

- Keller, G. A., Warner, T. G., Steimer, K. S., & Hallewell, R. A. (1991). Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7381–5. Retrieved from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kennedy, D., & Santella, R. (2004). 8-oxo-dG elevated in children during leukemia treatment. *Integrative Cancer ...*, 3(4), 301–309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523101>
- Kern, W., Bacher, U., & Haferlach, C. (2012). Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *British Journal of ...*, 86–96. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09010.x
- Ketterer, B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 16(10-11), 957–73. doi:10.3109/00498258609038976
- Kienle, D. L., Korz, C., Hosch, B., Benner, A., Mertens, D., Habermann, A., ... Stilgenbauer, S. (2005). Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(16), 3780–92. doi:10.1200/JCO.2005.02.568
- Kikuchi, S., Kobune, M., Iyama, S., Sato, T., Murase, K., Kawano, Y., ... Kato, J. (2012). Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(4), 643–8. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.006
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., ... Dalla-Favera, R. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(11), 1625–38. Retrieved from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193527&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Koníková, E., & Kusenda, J. (2003). Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma*, 50(1), 31–40. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687276>
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5751–4. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6279612>
- Kotkowska, A., Wawrzyniak, E., Blonski, J. Z., Robak, T., & Korycka-Wolowiec, A. (2011). Chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia detected by conventional cytogenetics with DSP30 as a single agent: comparison with FISH. *Leukemia Research*, 35(8), 1032–8. doi:10.1016/j.leukres.2011.01.020

## Bibliográfia

- Krinsky, N. I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annual Review of Nutrition*, 13, 561–87. doi:10.1146/annurev.nu.13.070193.003021
- Krober, A. (2006). Additional Genetic High-Risk Features Such As 11q Deletion, 17p Deletion, and V3-21 Usage Characterize Discordance of ZAP-70 and VH Mutation Status in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 24(6), 969–975. doi:10.1200/JCO.2005.03.7184
- Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., ... Stilgenbauer, S. (2002). V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(4), 1410–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149225>
- Kuku, I., Bayraktar, M. R., Kaya, E., Erkurt, M. A., Bayraktar, N., Cikim, K., & Aydogdu, I. (2005). Serum proinflammatory mediators at different periods of therapy in patients with multiple myeloma. *Mediators of Inflammation*, 2005(3), 171–4. doi:10.1155/MI.2005.171
- Kundu, N., Zhang, S., & Fulton, A. M. (1995). Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 13(1), 16–22. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7820952>
- Lampert IA, T. I. (1988). The spleen in chronic lymphocytic leukemia and related disorders. In C. D. Polliack A (Ed.), *Chronic lymphocytic leukemia* (pp. 193–208). Harwood Academic Publishers.
- Lanasa, M. C., Allgood, S. D., Slager, S. L., Camp, N., Spector, L., Rassenti, L., ... Levesque, M. C. (2008). Family-Associated Monoclonal B Lymphocytosis Is Commonly Oligoclonal and Expresses Markers Associated with Adverse Risk in CLL. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 112(11), 3144. Retrieved from: <http://abstracts.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/112/11/3144>
- Lanasa, M. C., Allgood, S. D., Slager, S. L., Dave, S. S., Love, C., Marti, G. E., ... Caporaso, N. E. (2011). Immunophenotypic and gene expression analysis of monoclonal B-cell lymphocytosis shows biologic characteristics associated with good prognosis CLL. *Leukemia*, 25(9), 1459–66. doi:10.1038/leu.2011.117
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., ... Wu, C. J. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4), 714–26. doi:10.1016/j.cell.2013.01.019
- Landgren, O., Albitar, M., Ma, W., Abbasi, F., Hayes, R. B., Ghia, P., ... Caporaso, N. E. (2009). B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 360(7), 659–67. doi:10.1056/NEJMoa0806122
- Larramendy, M. L., Siitonen, S. M., Zhu, Y., Hurme, M., Vilpo, L., Vilpo, J. A., & Knuutila, S. (1998). Optimized mitogen stimulation induces proliferation of neoplastic B cells in chronic lymphocytic leukemia: significance for cytogenetic analysis. The Tampere Chronic Lymphocytic Leukemia group. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82(3-4), 215–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858820>

- Lennert, K. (1978). *Malignant Lymphoma other than Hodgkins's disease* (Springer V.). Berlín.
- Lightfoot, T. J., Skibola, C. F., Smith, A. G., Forrest, M. S., Adamson, P. J., Morgan, G. J., ... Holly, E. A. (2006). Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, *91*(9), 1222–7. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956821>
- Lionetti, M., Fabris, S., Cutrona, G., Agnelli, L., Ciardullo, C., Matis, S., ... Neri, A. (2014). High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *British Journal of Haematology*, *165*(5), 629–39. doi:10.1111/bjh.12800
- Lodh, M., Goswami, B., Gupta, N., Patra, S. K., & Saxena, A. (2012). Assessment of oxidative stress and inflammatory process in patients of multiple myeloma. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, *27*(4), 410–3. doi:10.1007/s12291-012-0222-y
- Loft, S., & Poulsen, H. E. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *74*(6), 297–312. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8862511>
- López Guillermo, A., Cervantes, F., Bladé, J., Matutes, E., Urbano, A., Montserrat, E., & Rozman, C. (1989). Central nervous system involvement demonstrated by immunological study in prolymphocytic variant of chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematologica*, *81*(2), 109–11. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2496549>
- Macedo, G. S., Lisboa da Motta, L., Giacomazzi, J., Netto, C. B. O., Manfredini, V., Vanzin, C. S., ... Ashton-Prolla, P. (2012). Increased oxidative damage in carriers of the germline TP53 p.R337H mutation. *PloS One*, *7*(10), e47010. doi:10.1371/journal.pone.0047010
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, *424*(1-2), 83–95. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064852>
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*(3), 361–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688856>
- Marti, G. E., Carter, P., Abbasi, F., Washington, G. C., Jain, N., Zenger, V. E., ... Caporaso, N. (2003). B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *52*(1), 1–12. doi:10.1002/cyto.b.10013
- Marti, G. E., Rawstron, A. C., Ghia, P., Hillmen, P., Houlston, R. S., Kay, N., ... Caporaso, N. (2005). Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *British Journal of Haematology*, *130*(3), 325–32. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x

## Bibliografía

- Matutes, E., Oscier, D., Garcia-Marco, J., Ellis, J., Copplestone, A., Gillingham, R., ... Catovsky, D. (1996). Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *British Journal of Haematology*, *92*(2), 382–8. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603004>
- Mayr, C., Speicher, M. R., Kofler, D. M., Buhmann, R., Strehl, J., Busch, R., ... Wendtner, C.-M. (2006). Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *107*(2), 742–51. doi:10.1182/blood-2005-05-2093
- McCord, J. M. (1983). The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*, *94*(3), 412–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6310808>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *The Journal of Biological Chemistry*, *244*(22), 6049–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>
- Melchers, F., & Rolink, A. R. (2006). B cell tolerance--how to make it and how to break it. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *305*, 1–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724798>
- Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kowitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., ... Chiorazzi, N. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(3), 755–64. doi:10.1172/JCI23409
- Milne, G. L., Yin, H., Brooks, J. D., Sanchez, S., Jackson Roberts, L., & Morrow, J. D. (2007). Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods in Enzymology*, *433*, 113–26. doi:10.1016/S0076-6879(07)33006-1
- Misaki, K., Takitani, K., Ogihara, T., Inoue, A., Kawakami, C., Kuno, T., ... Tamai, H. (2003). Alpha-tocopherol content and alpha-tocopherol transfer protein expression in leukocytes of children with acute leukemia. *Free Radical Research*, *37*(9), 1037–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670011>
- Montserrat, E. (1994). Leucemia linfática crónica. In S.-S. J (Ed.), *Hematología Clínica* (III., pp. 354–364). Mosby/Doyma libros.
- Montserrat, E. (2006). New prognostic markers in CLL. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, (CII), 279–84. doi:10.1182/asheducation-2006.1.279
- Montserrat, E., & Moreno, C. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, *19 Suppl 7*, vii320–5. doi:10.1093/annonc/mdn460
- Montserrat, E., Rafael, M., & Bosch, F. (1998). Leucemia linfoides crónicas. *Haematologica*, *83*, 401–412.



- Montuschi, P., Barnes, P. J., & Ciabattini, G. (2010). Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath condensate. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 594, 73–84. doi:10.1007/978-1-60761-411-1\_5
- Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(15), 1791–800. doi:10.1096/fj.04-2330rev
- Morabito, F., Mosca, L., Cutrona, G., Agnelli, L., Tuana, G., Ferracin, M., ... Neri, A. (2013). Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(21), 5890–900. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0622
- Moran, E. C., Kamiguti, A. S., Cawley, J. C., & Pettitt, A. R. (2002). Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 116(2), 316–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841432>
- Morrow, J. D., Chen, Y., Brame, C. J., Yang, J., Sanchez, S. C., Xu, J., ... Roberts, L. J. (1999). The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metabolism Reviews*, 31(1), 117–39. doi:10.1081/DMR-100101910
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., & Roberts, L. J. (1990). A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(23), 9383–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (1996). The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochemical Pharmacology*, 51(1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8534261>
- Mosca, L., Fabris, S., Lionetti, M., Todoerti, K., Agnelli, L., Morabito, F., ... Neri, A. (2010). Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(23), 5641–53. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0151
- Mowat, M. R. (1998). p53 in tumor progression: life, death, and everything. *Advances in Cancer Research*, 74, 25–48. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9561266>
- Nakabeppu, Y., Tsuchimoto, D., Ichinoe, A., Ohno, M., Ide, Y., Hirano, S., ... Sakumi, K. (2004). Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011, 101–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126288>

## Bibliografía

- Navarro, J., Obrador, E., Pellicer, J. A., Aseni, M., Viña, J., & Estrela, J. M. (1997). Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(7), 1203–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9098094>
- Ng, D., Toure, O., Wei, M. M.-H., Arthur, D. C., Abbasi, F., Fontaine, L., ... Toro, J. R. (2007). Identification of a novel chromosome region, 13q21. 33-q22. 2, for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia. ..., 109(3), 916–925. doi:10.1182/blood-2006-03-011825.The
- Nicoloso, M. S., Kipps, T. J., Croce, C. M., & Calin, G. A. (2007). MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 139(5), 709–16. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06868.x
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. a, Greene, R. E., & Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31426–33. doi:10.1074/jbc.M212549200
- Nieto, W. G., Almeida, J., Romero, A., Teodosio, C., López, A., Henriques, A. F., ... Orfao, A. (2009). Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*, 114(1), 33–7. doi:10.1182/blood-2009-01-197368
- Nieto, W. G., Almeida, J., Teodosio, C., Abbasi, F., Allgood, S. D., Connors, F., ... Marti, G. E. (2010). Commentary: Comparison of current flow cytometry methods for monoclonal B cell lymphocytosis detection. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 78 Suppl 1, S4–9. doi:10.1002/cyto.b.20556
- Nieto, W. G., Teodosio, C., López, A., Rodríguez-Caballero, A., Romero, A., Bárcena, P., ... Almeida, J. (2010). Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 78 Suppl 1, S24–34. doi:10.1002/cyto.b.20543
- Nishiura, T., Suzuki, K., Kawaguchi, T., Nakao, H., Kawamura, N., Taniguchi, M., ... Taniguchi, N. (1992). Elevated serum manganese superoxide dismutase in acute leukemias. *Cancer Letters*, 62(3), 211–5. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1596865>
- Novak, A. J., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Kline, M. P., Manske, M. K., Slager, S., ... Ansell, S. M. (2006). Elevated serum B-lymphocyte stimulator levels in patients with familial lymphoproliferative disorders. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(6), 983–7. doi:10.1200/JCO.2005.02.7938
- Novotna, B., Bagryantseva, Y., Siskova, M., & Neuwirtova, R. (2009). Oxidative DNA damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, 33(2), 340–3. doi:10.1016/j.leukres.2008.07.005

- Nowak, R., Oelschlägel, U., Range, U., Bergmann, S., Bornhäuser, M., Hölig, C., ... Ehninger, G. (1999). Flow cytometric DNA quantification in immunophenotyped cells as a sensitive method for determination of aneuploid multiple myeloma cells in peripheral blood stem cell harvests and bone marrow after therapy. *Bone Marrow Transplantation*, 23(9), 895–900. doi:10.1038/sj.bmt.1701736
- O'Malley, D. P., Giudice, C., Chang, A. S., Chang, D., Barry, T. S., Hibbard, M. K., ... Chen, S.-T. (2011). Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 33(3), 238–44. doi:10.1111/j.1751-553X.2010.01284.x
- Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., ... Nakabeppu, Y. (2000). Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 28(6), 1355–64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=111038&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Oliva, M., Muñoz, P., Iradi, A., Tormos, M. C., Oltra, A. M., & Saez, G. T. (1999). Radicales libres y oxidación del DNA en la carcinogénesis humana. In S. T. GT; & Puig Parellada P (Eds.), *Radicales libres y estrés oxidativo en Biomedicina. Importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados. Departamento de Bioquímica y Biología molecular (FVEA., pp. 25–34). Universitat de València.*
- Oliva, M. R., Ripoll, F., Muñoz, P., Iradi, A., Trullenque, R., Valls, V., ... Sáez, G. T. (1997). Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Molecular Carcinogenesis*, 18(4), 232–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142218>
- Oltra, A. M., Carbonell, F., Tormos, C., Iradi, A., & Sáez, G. T. (2001). Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1286–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368926>
- Omoti, C. E., Awodu, O. A., & Bazuaye, G. N. (2007). Chronic lymphoid leukaemia: clinico-haematological correlation and outcome in a single institution in Niger Delta region of Nigeria. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29(6), 426–32. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.00888.x
- Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P. W., ... Oscier, D. G. (2004). ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 363(9403), 105–11. doi:10.1016/S0140-6736(03)15260-9
- Orlandi, E. M., Bernasconi, P., Pascutto, C., Giardini, I., Cavigliano, P. M., Boni, M., ... Cazzola, M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematological Oncology*, 31(3), 136–42. doi:10.1002/hon.2032

## Bibliográfia

- Oscier, D. G., Rose-Zerilli, M. J. J., Winkelmann, N., Gonzalez de Castro, D., Gomez, B., Forster, J., ... Strefford, J. C. (2013). The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*, *121*(3), 468–75. doi:10.1182/blood-2012-05-429282
- Oscier, D., Wade, R., Davis, Z., Morilla, A., Best, G., Richards, S., ... Catovsky, D. (2010). Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica*, *95*(10), 1705–12. doi:10.3324/haematol.2010.025338
- Ouillette, P., Erba, H., Kujawski, L., Kaminski, M., Shedden, K., & Malek, S. N. (2008). Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Research*, *68*(4), 1012–21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3105
- Ouillette, P., Fossum, S., Parkin, B., Ding, L., Bockenstedt, P., Al-Zoubi, A., ... Malek, S. N. (2010). Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *16*(3), 835–47. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2534
- Ouillette, P., Collins, R., Shakhani, S., Li, J., Li, C., Shedden, K., & Malek, S. N. (2011). The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(21), 6778–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0785
- Ouillette, P., Saiya-Cork, K., Seymour, E., Li, C., Shedden, K., & Malek, S. N. (2013). Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(11), 2893–904. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0138
- Oztürk, O., & Gümüşlü, S. (2004). Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. *Life Sciences*, *75*(13), 1551–65. doi:10.1016/j.lfs.2004.03.020
- Panayiotidis, M. (2008). Reactive oxygen species (ROS) in multistage carcinogenesis. *Cancer Letters*, *266*(1), 3–5. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.027
- Pande, D., Negi, R., Karki, K., Khanna, R. S., & Khanna, H. D. (2015). Oxidative damage and cell signaling transduction in patients of chronic myeloid leukemia. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. doi:10.1093/abbs/gmv029
- Pangalis, G. A., Moutsopoulos, H. M., Papadopoulos, N. M., Costello, R., Kokkinou, S., & Fessas, P. (1988). Monoclonal and oligoclonal immunoglobulins in the serum of patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematologica*, *80*(1), 23–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3135689>
- Parker, H., Rose-Zerilli, M. J. J., Parker, A., Chaplin, T., Wade, R., Gardiner, A., ... Strefford, J. C. (2011). 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *25*(3), 489–97. doi:10.1038/leu.2010.288

- Patten, P. E. M., Buggins, A. G. S., Richards, J., Wotherspoon, A., Salisbury, J., Mufti, G. J., ... Devereux, S. (2008). CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*, *111*(10), 5173–81. doi:10.1182/blood-2007-08-108605
- Paul, S., & De, M. (2010). Changes in anti-oxidant enzyme profile during haematological malignancy. *International Journal of Human Genetics*, *10*(4), 247–250.
- Paydas, S., Yuregir, G. T., Sahin, B., Seyrek, E., & Burgut, R. (1995). Intracellular glutathione content in leukemias. *Oncology*, *52*(2), 112–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854769>
- Petrola, M. J., de Castro, A. J. M., Pitombeira, M. H. da S., Barbosa, M. C., Quixadá, A. T. de S., Duarte, F. B., & Gonçalves, R. P. (2012). Serum concentrations of nitrite and malondialdehyde as markers of oxidative stress in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, *34*(5), 352–5. doi:10.5581/1516-8484.20120091
- Pettitt, A. R., Sherrington, P. D., Stewart, G., Cawley, J. C., Taylor, A. M., & Stankovic, T. (2001). p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood*, *98*(3), 814–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468183>
- Pflug, N., Bahlo, J., Shanafelt, T. D., Eichhorst, B. F., Bergmann, M. A., Elter, T., ... Hallek, M. (2014). Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *124*(1), 49–62. doi:10.1182/blood-2014-02-556399
- Porpaczy, E., Bilban, M., Heinze, G., Gruber, M., Vanura, K., Schwarzinger, I., ... Jaeger, U. (2009). Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *European Journal of Clinical Investigation*, *39*(7), 568–75. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02146.x
- Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., ... Campo, E. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. doi:10.1038/nature14666
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., ... Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, *475*(7354), 101–5. doi:10.1038/nature10113
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., ... González-díaz, M. (2012). Europe PMC Funders Group Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia, *475*(7354), 101–105. doi:10.1038/nature10113.Whole-genome
- Puiggros, A., Blanco, G., & Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International*, *2014*, 435983. doi:10.1155/2014/435983

## Bibliografía

- Puiggros, A., Delgado, J., Rodríguez-Vicente, A., Collado, R., Aventín, A., Luño, E., ... Espinet, B. (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *British Journal of Haematology*, 163(1), 47–54. doi:10.1111/bjh.12479
- Put, N., Konings, P., Rack, K., Jamar, M., Van Roy, N., Libouton, J.-M., ... Michaux, L. (2009). Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 48(10), 843–53. doi:10.1002/gcc.20691
- Que, T. H., Marco, J. G., Ellis, J., Matutes, E., Babapulle, V. B., Boyle, S., & Catovsky, D. (1993). Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood*, 82(2), 571–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7687164>
- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G. R., Jares, P., Bassaganyas, L., ... López-Otín, C. (2012). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 44(1), 47–52. doi:10.1038/ng.1032
- Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J. M., Barrena, S., Sánchez, M. L., ... Orfao, A. (2008). Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 74(3), 139–49. doi:10.1002/cyto.b.20390
- Rachel, J. M., Zucker, M. L., Fox, C. M., Plapp, F. V., Menitove, J. E., Abbasi, F., & Marti, G. E. (2007). Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *British Journal of Haematology*, 139(5), 832–6. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06870.x
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2), 219–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1139039>
- Rasi, S., Monti, S., Spina, V., Foà, R., Gaidano, G., & Rossi, D. (2012). Analysis of NOTCH1 mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica*, 97(1), 153–4. doi:10.3324/haematol.2011.053090
- Rasool, M., Farooq, S., Malik, A., Shaukat, A., Manan, A., Asif, M., ... Hussain, A. (2015). Assessment of circulating biochemical markers and antioxidative status in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) patients. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 106–11. doi:10.1016/j.sjbs.2014.09.002
- Rassenti, L. Z., Huynh, L., Toy, T. L., Chen, L., Keating, M. J., Gribben, J. G., ... Kipps, T. J. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 351(9), 893–901. doi:10.1056/NEJMoa040857

- Rassenti, L. Z., Jain, S., Keating, M. J., Wierda, W. G., Grever, M. R., Byrd, J. C., ... Kipps, T. J. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *112*(5), 1923–30. doi:10.1182/blood-2007-05-092882
- Rawstron, A. C., Yuille, M. R., Fuller, J., Cullen, M., Kennedy, B., Richards, S. J., ... Houlston, R. S. (2002). Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*, *100*(7), 2289–90. doi:10.1182/blood-2002-03-0892
- Rawstron, A. C., Bennett, F., & Hillmen, P. (2007). The biological and clinical relationship between CD5+23+ monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *139*(5), 724–9. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06863.x
- Rawstron, A. C., Bennett, F. L., O'Connor, S. J. M., Kwok, M., Fenton, J. A. L., Plummer, M., ... Hillmen, P. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *359*(6), 575–83. doi:10.1056/NEJMoa075290
- Rawstron, A. C., Shanafelt, T., Lanasa, M. C., Landgren, O., Hanson, C., Orfao, A., ... Ghia, P. (2010). Different biology and clinical outcome according to the absolute numbers of clonal B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *78 Suppl 1*, S19–23. doi:10.1002/cyto.b.20533
- Ray, G., Batra, S., Shukla, N. K., Deo, S., Raina, V., Ashok, S., & Husain, S. A. (2000). Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *59*(2), 163–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817351>
- Reddy, K. S. (2006). Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *British Journal of Haematology*, *132*(6), 705–22. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05919.x
- Reiter, R. J. (1995). Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging (Milan, Italy)*, *7*(5), 340–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719600>
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, S. D. (2008). *SEER Can Statistics Review*.
- Rigolin, G. M., Cibien, F., Martinelli, S., Formigaro, L., Rizzotto, L., Tammiso, E., ... Cuneo, A. (2012). Brief report Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “ normal ” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*, *119*(10), 2310–2313. doi:10.1182/blood-2011-11-395269
- Rinaldi, A., Mian, M., Kwee, I., Rossi, D., Deambrogi, C., Mensah, A. A., ... Bertoni, F. (2011). Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *154*(5), 590–599. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08789.x

## Bibliografía

- Roberts, L. J., & Morrow, J. D. (1997). The generation and actions of isoprostanes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1345(2), 121–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106492>
- Rodríguez, A. E., Hernández, J. Á., Benito, R., Gutiérrez, N. C., García, J. L., Hernández-Sánchez, M., ... Hernández-Rivas, J. M. (2012). Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PloS One*, 7(11), e48485. doi:10.1371/journal.pone.0048485
- Rodríguez, A. E., Robledo, C., García, J. L., González, M., Gutiérrez, N. C., Hernández, J. A., ... Hernández, J. M. (2012). Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(8), 2138–46. doi:10.1093/annonc/mdr579
- Rodríguez-Vicente, A. E., Díaz, M. G., & Hernández-Rivas, J. M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genetics*, 206(3), 49–62. doi:10.1016/j.cancergen.2013.01.003
- Rosenwald, A., Alizadeh, A. A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R. E., Yu, X., ... Staudt, L. M. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(11), 1639–47. Retrieved from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rosenwald, A., Chuang, E. Y., Davis, R. E., Wiestner, A., Alizadeh, A. A., Arthur, D. C., ... Staudt, L. M. (2004). Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood*, 104(5), 1428–34. doi:10.1182/blood-2003-09-3236
- Rossi, D., Bruscaggin, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., ... Gaidano, G. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, 118(26), 6904–8. doi:10.1182/blood-2011-08-373159
- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., ... Gaidano, G. (2012). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(12), 2854–62. doi:10.1182/blood-2011-12-395673
- Rossi, D., Rasi, S., Fabbri, G., Spina, V., Fangazio, M., Forconi, F., ... Gaidano, G. (2011). Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(2), 521–529. doi:10.1182/blood-2011-09-379966
- Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., ... Gaidano, G. (2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(8), 1403–12. doi:10.1182/blood-2012-09-458265



- Rossi, D., Sozzi, E., Puma, A., De Paoli, L., Rasi, S., Spina, V., ... Forconi, F. (2009). The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *British Journal of Haematology*, 146(1), 64–75. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07711.x
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Larissa, S., Kravchenko, J. E., & Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Med*, 11(12), 1306–1313. doi:10.1038/nm1320.The
- Sáez GT, Oliva MR, Muñiz P, Valls V, Iradi A, Ramos M, C. J. (1995). *Estrés oxidativo y daño del material genético*.
- Sahota, S. S., Davis, Z., Hamblin, T. J., & Stevenson, F. K. (2000). Somatic mutation of bcl-6 genes can occur in the absence of V(H) mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 95(11), 3534–40. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828040>
- Salvador, A., Donderis, S., Olivares, C., Guaita, M., Espinosa, O., Rodríguez, J., ... Sáez, G. (2006). El estrés oxidativo en la patología degenerativa Mecanismos de acción y marcadores de lesión molecular. *Quími Clín*, 25(2), 49–57. Retrieved from: [http://www.seqc.es/es/Publicaciones/1002/7/100/Quim\\_Clin\\_2006\\_25\\_\(2\)\\_49-57](http://www.seqc.es/es/Publicaciones/1002/7/100/Quim_Clin_2006_25_(2)_49-57)
- Scarfò, L., Dagklis, A., Scielzo, C., Fazi, C., & Ghia, P. (2010). CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it? *Seminars in Cancer Biology*, 20(6), 384–90. doi:10.1016/j.semcancer.2010.08.005
- Scarfò, L., Zibellini, S., Tedeschi, A., Maura, F., Neri, A., Bertazzoni, P., ... Ghia, P. (2012). Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines? *Leukemia*, 26(7), 1703–7. doi:10.1038/leu.2012.20
- Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G. A., Döhner, H., & Lichter, P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(2), 748–53. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397742>
- Schroeder, H. W., & Dighiero, G. (1994). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology Today*, 15(6), 288–94. doi:10.1016/0167-5699(94)90009-4
- Schroers, R., Griesinger, F., Trümper, L., Haase, D., Kulle, B., Klein-Hitpass, L., ... Dürig, J. (2005). Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 19(5), 750–8. doi:10.1038/sj.leu.2403707
- Schüep, W., & Rettenmaier, R. (1994). Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, 234, 294–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7808296>
- Schuh, A., Becq, J., Humphray, S., Alexa, A., Burns, A., Clifford, R., ... Bentley, D. (2012). Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*, 120(20), 4191–6. doi:10.1182/blood-2012-05-433540

## Bibliografía

- Schwaenen, C., Nessling, M., Wessendorf, S., Salvi, T., Wrobel, G., Radlwimmer, B., ... Lichter, P. (2004). Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(4), 1039–44. doi:10.1073/pnas.0304717101
- Sembries, S., Pahl, H., Stilgenbauer, S., Döhner, H., & Schriever, F. (1999). Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood*, *93*(2), 624–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885225>
- Seney, F. D., Federgreen, W. R., Stein, H., & Kashgarian, M. (1986). A review of nephrotic syndrome associated with chronic lymphocytic leukemia. *Archives of Internal Medicine*, *146*(1), 137–41. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3942445>
- Sentürker, S., Karahalil, B., Inal, M., Yilmaz, H., Müslümanoğlu, H., Gedikoglu, G., & Dizdaroglu, M. (1997). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Letters*, *416*(3), 286–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373171>
- Seven, A., Civelek, S., Inci, E., Inci, F., Korkut, N., & Burçak, G. (1999). Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma. *Clinical Biochemistry*, *32*(5), 369–73. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480452>
- Shacter, E., Williams, J. a, Hinson, R. M., Sentürker, S., & Lee, Y. J. (2000). Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*, *96*(1), 307–13. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891466>
- Shanafelt, T. D., Ghia, P., Lanasa, M. C., Landgren, O., & Rawstron, A. C. (2010). Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*, *24*(3), 512–20. doi:10.1038/leu.2009.287
- Shanafelt, T. D., Hanson, C., Dewald, G. W., Witzig, T. E., LaPlant, B., Abrahamson, J., ... Kay, N. E. (2008). Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *26*(14), e5–6. doi:10.1200/JCO.2008.16.7874
- Shanafelt, T. D., Kay, N. E., Call, T. G., Zent, C. S., Jelinek, D. F., LaPlant, B., ... Hanson, C. A. (2008). MBL or CLL: which classification best categorizes the clinical course of patients with an absolute lymphocyte count  $\geq 5 \times 10^9$  L<sup>-1</sup> but a B-cell lymphocyte count  $< 5 \times 10^9$  L<sup>-1</sup>? *Leukemia Research*, *32*(9), 1458–61. doi:10.1016/j.leukres.2007.11.030
- Shanafelt, T. D., Kay, N. E., Jenkins, G., Call, T. G., Zent, C. S., Jelinek, D. F., ... Hanson, C. a. (2009). B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood*, *113*(18), 4188–96. doi:10.1182/blood-2008-09-176149

- Shanafelt, T. D., Kay, N. E., Rabe, K. G., Call, T. G., Zent, C. S., Maddocks, K., ... Hanson, C. A. (2009). Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(24), 3959–63. doi:10.1200/JCO.2008.21.2704
- Shanafelt, T. D., Witzig, T. E., Fink, S. R., Jenkins, R. B., Paternoster, S. F., Smoley, S. A., ... Dewald, G. W. (2006). Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(28), 4634–41. doi:10.1200/JCO.2006.06.9492
- Shanafelt, T., & Hanson, C. A. (2009). Monoclonal B-cell lymphocytosis: definitions and natural history. *Leukemia & Lymphoma*, 50(3), 493–7. doi:10.1080/10428190902763483
- Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308), 431–4. doi:10.1038/349431a0
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(4), 197–210. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847781>
- Shim, Y. K., Middleton, D. C., Caporaso, N. E., Rachel, J. M., Landgren, O., Abbasi, F., ... Vogt, R. F. (2010). Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: a systematic review. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 78 Suppl 1, S10–8. doi:10.1002/cyto.b.20538
- Shim, Y. K., Vogt, R. F., Middleton, D., Abbasi, F., Slade, B., Lee, K. Y., & Marti, G. E. (2007). Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 72(5), 344–53. doi:10.1002/cyto.b.20174
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058–1071. doi:10.1002/anie.198610581
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 311(1152), 617–31. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2869521>
- Silber, R., Farber, C. M., Papadopoulos, E., Nevrla, D., Liebes, L., Bruck, M., ... Canellakis, Z. N. (1992). Glutathione depletion in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. *Blood*, 80(8), 2038–43. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1356514>
- Slager, S. L., Kay, N. E., Fredericksen, Z. S., Wang, A. H., Liebow, M., Cunningham, J. M., ... Cerhan, J. R. (2007). Susceptibility genes and B-chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 139(5), 762–71. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06872.x

## Bibliográfia

- Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Boudjograh, M., Guida, G., Smilevska, T., ... Davi, F. (2007). Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, *109*(1), 259–70. doi:10.1182/blood-2006-03-012948
- Stilgenbauer, S., Liebisch, P., James, M. R., Schröder, M., Schlegelberger, B., Fischer, K., ... Döhner, H. (1996). Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(21), 11837–41. Retrieved from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38145&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stilgenbauer, S., Schaffner, C., Winkler, D., Ott, G., Leupolt, E., Bentz, M., ... Döhner, H. (2000). The ATM gene in the pathogenesis of mantle-cell lymphoma. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, *11 Suppl 1*, 127–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707794>
- Stilgenbauer, S., Schnaiter, A., Paschka, P., Zenz, T., Rossi, M., Döhner, K., ... Döhner, H. (2014). Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*, *123*(21), 3247–54. doi:10.1182/blood-2014-01-546150
- Sun, Y. (1990). Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, *8*(6), 583–99. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2193855>
- Sutton, L.-A., & Rosenquist, R. (2015). Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica*, *100*(1), 7–16. doi:10.3324/haematol.2014.115923
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, *51*(3), 794–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1846317>
- Szent-Györgyi, A. (1928). Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex: Description of a new carbohydrate derivative. *The Biochemical Journal*, *22*(6), 1387–409. Retrieved from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1252273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Takao, N., Li, Y., & Yamamoto, K. (2000). Protective roles for ATM in cellular response to oxidative stress. *FEBS Letters*, *472*(1), 133–6. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781820>
- Tam, C. S., & Seymour, J. F. (2014). A new prognostic score for CLL. *Blood*, *124*(1), 1–2. doi:10.1182/blood-2014-05-575407
- Tam, C. S., Shanafelt, T. D., Wierda, W. G., Abruzzo, L. V, Van Dyke, D. L., O'Brien, S., ... Keating, M. J. (2009). De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*, *114*(5), 957–64. doi:10.1182/blood-2009-03-210591

- Thacker, J. (2005). The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Letters*, 219(2), 125–35. doi:10.1016/j.canlet.2004.08.018
- Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 57(3-4), 145–55. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818476>
- Tuck, a, Smith, S., & Larcom, L. (2000). Chronic lymphocytic leukemia lymphocytes lack the capacity to repair UVC-induced lesions. *Mutation Research*, 459(1), 73–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677685>
- Tuck, A., Smith, S., Whitesides, J. F., & Larcom, L. (1999). Hypersensitivity of lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients to ultraviolet light-C radiation. *Leukemia & Lymphoma*, 36(1-2), 169–77. doi:10.3109/10428199909145961
- Tudek, B., Winczura, A., Janik, J., Siomek, A., Foksinski, M., & Oliński, R. (2010). Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *American Journal of Translational Research*, 2(3), 254–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2892402&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Türk, W. (1903). Ein System der Lymphomatosen. *Wien Klin Wochenshr*, 16, 1073–1089.
- Udensi, U. K., & Tchounwou, P. B. (2014). Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 33(1), 106. doi:10.1186/s13046-014-0106-5
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 27(2), 120–39. doi:10.1080/10590500902885684
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Van de Castele, M., Verhoef, G. E., Demuyne, H., Zacheé, P., & Boogaerts, M. A. (1994). Hypercalcemia, monoclonal protein, and osteolytic bone lesions in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology*, 69(2), 79–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080883>
- Van Den Neste, E., Robin, V., Francart, J., Hagemeyer, A., Stul, M., Vandenberghe, P., ... Michaux, L. (2007). Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia*, 21(8), 1715–22. doi:10.1038/sj.leu.2404764
- Van Dyke, D. L., Shanafelt, T. D., Call, T. G., Zent, C. S., Smoley, S. A., Rabe, K. G., ... Kay, N. E. (2010). A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 148(4), 544–50. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07982.x

## Bibliográfia

- Vardi, A., Dagklis, A., Scarfò, L., Jelinek, D., Newton, D., Bennett, F., ... Ghia, P. (2013). Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood*, *121*(22), 4521–8. doi:10.1182/blood-2012-12-471698
- Viña, J., Viña, J. R. and S. G. T. (1986). Glutathione: Metabolism and physiological functions. (Review). *Life Chem. Reports*, *4*, 1–35.
- Viña, J.R., Sáez, G.T. and Viña, J. (1989). The physiological functions of glutathione. CRC Handbook. Biomedicine of Free Radicals and Antioxidants. ((J. Miquel., pp. 121–131).
- Vroblová, V., Smolej, L., Vrbacký, F., Jankovicová, K., Hrudková, M., Malý, J., & Krejsek, J. (2009). Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*, *52*(1), 3–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754000>
- Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., ... Wu, C. J. (2011). SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *365*(26), 2497–506. doi:10.1056/NEJMoa1109016
- Wang, S. S., Davis, S., Cerhan, J. R., Hartge, P., Severson, R. K., Cozen, W., ... Rothman, N. (2006). Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*, *27*(9), 1828–34. doi:10.1093/carcin/bgl013
- Wiestner, A. (2005). More ZAP for chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*, *105*(5), 1839–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747395>
- William, J., Euler, C., Christensen, S., & Shlomchik, M. J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5589), 2066–70. doi:10.1126/science.1073924
- Woyach, J. A. (2013). Survival of the weak (signalers): anergy in CLL. *Blood*, *121*(19), 3781–3. doi:10.1182/blood-2013-03-489849
- Yazdanpanah, M., Luo, X., Lau, R., Greenberg, M., Fisher, L. J., & Lehotay, D. C. (1997). Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, *23*(6), 870–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378366>
- Yeh, C.-C., Hou, M.-F., Tsai, S.-M., Lin, S.-K., Hsiao, J.-K., Huang, J.-C., ... Tsai, L.-Y. (2005). Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *361*(1-2), 104–11. doi:10.1016/j.cccn.2005.05.002
- Yuille, M. R., Houlston, R. S., & Catovsky, D. (1998). Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, *12*(11), 1696–8. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823943>
- Zelen, I., & Djurdjevic, P. (2010). Antioxidant enzymes activities and plasma levels of oxidative stress markers in B-chronic lymphocytic leukemia patients. *Journal of BU ON.: ...*, *15*(2), 330–336. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658731>

- Zenz, T., Benner, A., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2008). Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 297(24), 3810–4. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098429>
- Zenz, T., Kröber, A., Scherer, K., Häbe, S., Bühler, A., Benner, A., ... Stilgenbauer, S. (2008). Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, 112(8), 3322–9. doi:10.1182/blood-2008-04-154070
- Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, 10, 37–50. doi:10.1038/nrc2764
- Zhou, F., Zhang, W., Wei, Y., Zhou, D., Su, Z., Meng, X., ... Tian, W. (2007). The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leukemia Research*, 31(3), 387–93. doi:10.1016/j.leukres.2006.07.014
- Zhou, F.-L., Zhang, W.-G., Wei, Y.-C., Meng, S., Bai, G.-G., Wang, B.-Y., ... Chen, S.-P. (2010). Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15010–5. doi:10.1074/jbc.M110.103713
- Zhou, Y., & Hileman, E. (2003). Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. ..., 101(10), 4098–4104. doi:10.1182/blood-2002-08-2512.Supported
- Zhu, Y., Monni, O., El-Rifai, W., Siitonen, S. M., Vilpo, L., Vilpo, J., & Knuutila, S. (1999). Discontinuous deletions at 11q23 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 13(5), 708–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374874>
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2011). Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711(1-2), 167–73. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015